

**Kinetische Untersuchungen zur Aktivierung
von
N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften**

vorgelegt beim Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe - Universität
in Frankfurt am Main

von
Wolfgang Maier
aus Straubing

Frankfurt 2004

(D F 1)

Die Arbeit wurde in der Abteilung Neurochemie des Max-Planck-Instituts für Hirnforschung sowie in der Abteilung Biophysikalische Chemie des Max-Planck-Instituts für Biophysik in Frankfurt am Main durchgeführt und vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe - Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. Ernst Bamberg

Prof. Dr. Heinrich Betz

Datum der Disputation: 24. Februar 2005

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	3
1.	Überblick	3
2.	NMDA-Rezeptoren sind Vertreter der Familie ionotroper Glutamat-rezeptoren	3
3.	NMDA-Rezeptoren arbeiten als molekulare Koinzidenzdetektoren	4
4.	Die unterschiedlichen Aufgaben von NMDA- und Nicht-NMDA-Rezeptoren bedingen unterschiedliche Aktivierungskinetiken	6
5.	iGluRs sind an der Synapse in ein komplexes Netzwerk von Proteinen integriert	7
6.	NMDA-Rezeptoren sind tetramere Proteinkomplexe aus glutamat- und glyzinbindenden Untereinheiten	9
7.	Molekulare Betrachtung der Funktionsweise von iGluRs	13
8.	Projektvorstellung	17
II.	Material und Methoden	21
1.	Molekular- und Zellbiologie	21
1.1	Zellen, Zellkulturmedien und Medienzusätze	21
1.2	Kits	21
1.3	Molekularbiologische Agenzien	22
1.4	Ortsgerichtete Mutagenese	23
1.5	Plasmidsequenzierung	23
1.6	Plasmidpräparation	24
1.7	Zellkultur	24
1.8	Transiente Transfektion	24
2.	Elektrophysiologie und Datenauswertung	25
2.1	Geräte	25
2.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	26
2.3	Lösungen für Elektrophysiologie	26
2.4	Elektrophysiologische Methoden	27
2.5	Datenauswertung	31
III.	Ergebnisse	38
1.	Auswahl geeigneter caged compounds für Versuche an NMDA-Rezeptoren	38
1.1	CNB-Verbindungen inhibieren den NMDA-Rezeptor	38
1.2	NI- und MNI-maskierte Liganden sind inert am NMDA-Rezeptor	41
2.	Kinetische Charakterisierung von wt NMDA-Rezeptoren	46
2.1	NR1/NR2A-Rezeptoren	46
2.2	NR1/NR2B-Rezeptoren	52
2.3	Aktivierungskinetiken mit L-Aspartat	53
2.4	Koexpression mit PSD95	54

3.	Kinetische Charakterisierung mutanter NMDA-Rezeptoren	57
3.1	NR1/NR2A(H460A)	57
3.2	NR1/NR2A(E387A)	58
3.3	NR1/NR2A(K459E)	60
3.4	NR1/NR2A(N665D)	61
3.5	NR1/NR2A(K459N) und NR1/NR2A(N665K)	62
4.	Einzelkanalmessungen an wt- und NR1/NR2A(N665D)-Rezeptoren	63
IV.	Diskussion	68
1.	Beurteilung des methodischen Ansatzes	69
1.1	Vergleich mit alternativen Methoden	69
1.2	Anmerkungen zum verwendeten kinetischen Modell	72
2.	Ergebnisse mit wt-NMDA-Rezeptoren	78
2.1	Vergleich mit anderen Rezeptoren und Literaturwerten	78
2.2	Koexpression mit PSD95	80
3.	Ergebnisse mit mutanten Rezeptoren	81
4.	Bedeutung der Mutation N665D	91
5.	Abschließende Bewertung	93
V.	Zusammenfassung	95
VI.	Literaturverzeichnis	97
	Anhänge	106
A	Verzeichnis der Abkürzungen	106
B	Das <i>binding gating dilemma</i>	107
C	Käfigverbindungen zur Verwendung an NMDA-Rezeptoren	111
D	Eine energetische Betrachtung der Bedeutung von Ratenkonstanten	114
E	Umsetzung des kinetischen Modells in die Skriptsprache der Berkeley Madonna Software	119

I. Einleitung

1. Überblick

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, das Verständnis der molekularen Vorgänge bei der Aktivierung von NMDA-Rezeptoren zu vertiefen. Für NMDA-Rezeptoren ist, ebenso wie für andere ligandengesteuerte Ionenkanäle, nur unzureichend verstanden, wie das Signal der Ligandenbindung an den Rezeptor in die Öffnung des Ionenkanals umgesetzt wird. Hier soll speziell untersucht werden, inwieweit ligandeninduzierte Konformationsänderungen im Bereich der Ligandenbindungsstelle an der Weiterleitung dieses Signals an die Kanalregion und damit an der Öffnung des Ionenkanals beteiligt sind. Dazu werden sowohl wt-Rezeptoren als auch Rezeptoren mit einzelnen Aminosäureaustauschen in der Ligandenbindungsdomäne elektrophysiologisch auf ihre Aktivierungskinetiken untersucht. Auf diese Weise werden Aminosäurereste in der Nähe der Bindungsstelle identifiziert, die eine Rolle bei der Kanalöffnung spielen. Zusammen mit Strukturmodellen der Ligandenbindungsdomäne des Rezeptors lassen diese Ergebnisse Rückschlüsse auf die Prozesse zu, die unmittelbar nach Bindung des Liganden stattfinden und letztendlich in der Kanalöffnung resultieren.

Zunächst möchte ich jedoch das untersuchte System vorstellen. Die folgenden Abschnitte fassen daher in knapper Form zusammen, was derzeit über den Aufbau von NMDA-Rezeptoren und ihre Rolle im Nervensystem, sowie über den Mechanismus der Kanalaktivierung bekannt ist.

2. NMDA-Rezeptoren sind Vertreter der Familie ionotroper

Glutamaterezeptoren

NMDA (N-Methyl-D-aspartat)-Rezeptoren bilden zusammen mit AMPA (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat)- und Kainatrezeptoren die Familie der ionotropen Glutamaterezeptoren (iGluRs) (Übersicht in [27]). Bei allen bekannten Vertretern dieser Familie handelt es sich um ligandengesteuerte Kationenkanäle,

deren physiologischer Agonist in fast allen Fällen der Neurotransmitter L-Glutamat ist. Die Unterteilung in die genannten Untergruppen gründet sich auf deren pharmakologische Unterscheidbarkeit mittels der drei namensgebenden, weitgehend selektiv die nach ihnen benannten Rezeptoren aktivierenden synthetischen Agonisten. Die durch NMDA aktivierbaren Vertreter der iGluRs nehmen in mehrerlei Hinsicht eine Sonderstellung innerhalb der Familie ein, die sie deutlich von AMPA- und Kainatrezeptoren, die häufig auch unter dem Begriff Nicht-NMDA-Rezeptoren zusammengefaßt werden, unterscheidet. Die auffälligsten Unterschiede zwischen NMDA- und Nicht-NMDA-Rezeptoren sind wohl die Glyzinabhängigkeit ([47],[94]) der ersten, ihre Permeabilität für Kalzium [65] und ihre Inhibierung durch Magnesium [66], sowie Unterschiede in den Glutamataffinitäten [27] und den Aktivierungskinetiken. Diese Unterschiede sollen in den folgenden drei Abschnitten ausführlicher behandelt werden. Eine exzellente Darstellung der meisten Punkte, auf die hierbei eingegangen wird, bietet auch [64].

3. NMDA-Rezeptoren arbeiten als molekulare Koinzidenzdetektoren

In allen Vertretern der iGluR-Familie ist physiologisch die Bindung des Neurotransmitters Glutamat an die Öffnung eines kationselektiven Kanals gekoppelt. Während jedoch die meisten AMPA- und Kainatrezeptorkanäle ausschließlich für monovalente Kationen, d.h. unter physiologischen Bedingungen Natrium und Kalium, permeabel sind, weisen NMDA-Rezeptorkanäle zusätzlich eine hohe Leitfähigkeit für Kalzium auf, die sogar deutlich höher ist als die für Natrium oder Kalium ($pCa/pNa \approx 10$ [65]).

NMDA- und Nicht-NMDA-Rezeptoren sind im zentralen Nervensystem (ZNS) häufig zusammen an der Oberfläche derselben Neuronen exprimiert und in der Regel postsynaptisch lokalisiert. Bei einer Glutamatausschüttung in den synaptischen Spalt werden die verschiedenen iGluRs daher prinzipiell gemeinsam aktiviert. Einer der wesentlichen Unterschiede zwischen den Rezeptortypen ist jedoch, daß NMDA-Rezeptoren bei Spannungen in der Nähe des zellulären

Ruhepotentials durch extrazelluläres Magnesium inhibiert werden [66], indem Magnesiumionen den Ionenkanal blockieren. Der offene Ionenkanal ist von der extrazellulären Seite her zugänglich für Magnesiumionen, die den Kanal aber nicht passieren können, sondern ihn bildlich gesprochen „verstopfen“. Die elektrostatische Anziehung zwischen dem positiv geladenen Ion und dem negativen Zellinneren wirkt einer Rückdiffusion des Magnesiums in den Extrazellularraum entgegen. Dieser Mechanismus führt dazu, daß bei einer Aktivierung der Synapse öffnende NMDA-Rezeptoren rasch blockiert werden. Aufgrund der schnellen Kinetik des Magnesiumblocks ist der Beitrag von NMDA-Rezeptoren zum synaptischen Gesamtstrom unter diesen Bedingungen vernachlässigbar. Die verbleibende Stromkomponente wird durch Nicht-NMDA-Rezeptoren vermittelt und aufgrund der Selektivität dieser Kanäle vor allem durch Natrium- und Kaliumionen getragen. Anders verhält es sich hingegen, wenn das betrachtete Neuron zum Zeitpunkt der Glutamatausschüttung im Bereich der Synapse bereits ausreichend depolarisiert ist, beispielsweise durch eine unmittelbar vorausgegangene Aktivierung derselben oder eine entsprechend starke Aktivierung einer benachbarten Synapse. Unter diesen Bedingungen ist der Magnesiumblock unwirksam, weil die Rückdiffusion von in die Kanalpore gelangenden Magnesiumionen beschleunigt ist, und die kalziumleitenden NMDA-Rezeptoren tragen mit zum postsynaptischen Strom bei. Da Kalzium, anders als Natrium und Kalium, im Zellinneren als sekundärer Botenstoff (*second messenger*) wirkt, beschränkt sich die Wirkung eines Kalziumeinstroms nicht allein auf eine vorübergehende Depolarisierung der Zelle, sondern umfaßt auch längeranhaltende Veränderungen im Zustand der Zelle, wie zum Beispiel in ihrem Genexpressionsmuster. Die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren signalisiert also die Aktivierung eines Neurons durch mehrere gleichzeitig oder unmittelbar nacheinander eingehende Stimuli und kann zu anhaltenden Veränderungen im betroffenen Neuron führen. Damit bildet das Zusammenspiel von NMDA- und Nicht-NMDA-Rezeptoren eine der molekularen Grundlagen der Plastizität des Nervensystems, d.h.

seiner Fähigkeit zu Veränderung und Anpassung, und damit letztlich von Lernvorgängen.

4. Die unterschiedlichen Aufgaben von NMDA- und Nicht-NMDA-Rezeptoren bedingen unterschiedliche Aktivierungskinetiken

In Anbetracht der im vorherigen Abschnitt verdeutlichten, sehr unterschiedlichen physiologischen Aufgaben von NMDA- und Nicht-NMDA-Rezeptoren überrascht es kaum, daß sich die beiden Gruppen auch hinsichtlich kinetischer Parameter stark unterscheiden. AMPA- und Kainatrezeptoren weisen erwartungsgemäß sehr schnelle Aktivierungskinetiken auf (Stromanstieg mit $\tau < 1$ ms [30]), was die schnelle Umwandlung des chemischen Signals an der Synapse in ein elektrisches und damit die schnelle Reizleitung gewährleistet. Ihre relativ geringen Affinitäten ($EC_{50} \approx 500$ μ M [27]) für Glutamat unterstützen die Signalbeendigung durch Diffusion und Glutamattransporter, die Glutamat aus dem synaptischen Spalt entfernen, und führen zusammen mit hohen Desensitisierungsraten ($\tau \approx 1 - 5$ ms [27]) zu enger zeitlicher Begrenzung einzelner Nicht-NMDA-Rezeptoraktivierungen. Dagegen scheinen NMDA-Rezeptoren darauf optimiert zu sein, möglichst fehlerfrei ihre Funktion als Koinzidenzdetektoren zu erfüllen. Langsame Aktivierungskinetiken ($\tau \approx 10$ ms [30]) sorgen für eine Verzögerung zwischen Nicht-NMDA- und NMDA-Rezeptoraktivierung, die nötig ist, damit NMDA-Rezeptoren nicht bei jeder Glutamatausschüttung allein durch die Nicht-NMDA-Rezeptor-vermittelte Depolarisierung entblockt werden. Mit anderen Worten, NMDA-Rezeptoren öffnen größtenteils erst während der repolarisierenden Phase der zugehörigen Nicht-NMDA-Rezeptoraktivierung, wenn der Magnesiumblock bereits wieder ausreichend wirksam ist. Andererseits sinkt zu diesem Zeitpunkt auch die Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt bereits wieder ab [26], was eine Erklärung für die vergleichsweise hohe Affinität von NMDA-Rezeptoren (EC_{50} für Glutamat ≈ 1 μ M, leicht unterschiedlich zwischen Subtypen [27]) sein dürfte. Die langsame ($\tau \approx 700$ ms) und unvoll-

ständige Desensibilisierung dieser Rezeptoren [27] gewährleistet einen robusten Kalziumeinstrom, der die Stärke und Dauer anhaltender Stimuli widerspiegelt.

5. iGluRs sind an der Synapse in ein komplexes Netzwerk von Proteinen integriert

Synapsen sind hochgradig spezialisierte und äußerst komplex aufgebaute Zellkompartimente, in denen Ionenkanäle nicht einfach als isolierte Moleküle funktionieren. Glutamaterge Synapsen stellen dabei den wohl am ausgiebigsten untersuchten Typ dar. Elektronenmikroskopisch ist er durch einen subsynaptischen etwa 50 nm breiten Streifen [62] elektronendichten Materials gekennzeichnet, der als postsynaptische Dichte (PSD) bezeichnet wird. Zahlreiche Analysen der PSD ergeben

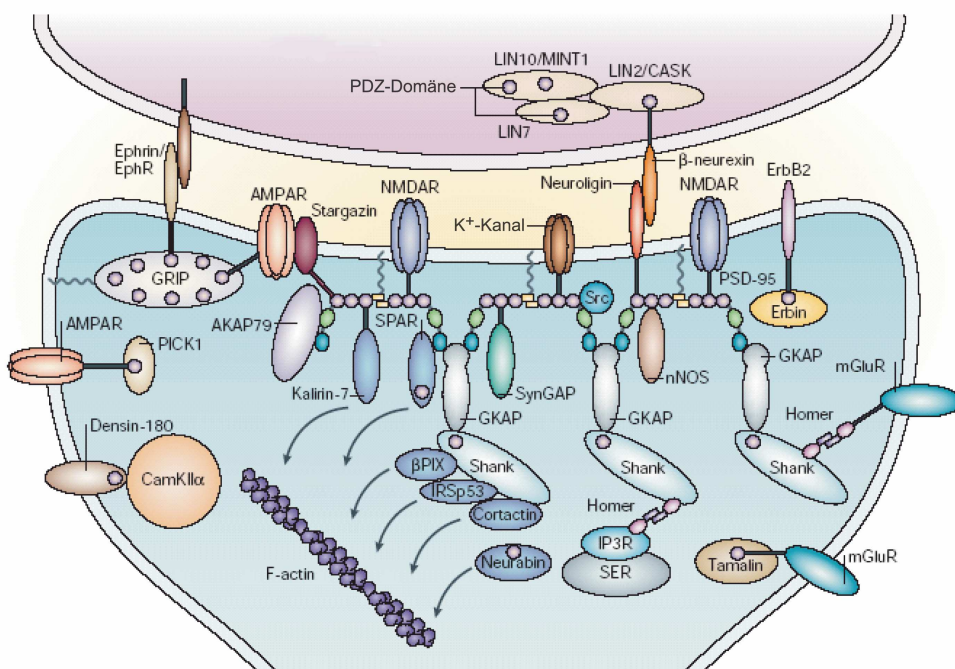


Abb. 1: Wechselwirkungen zwischen Proteinen glutamaterger Synapsen (aus [49]).

Die gezeigten Interaktionen sollen lediglich die Komplexität der Vernetzung deutlich machen und werden hier nicht näher besprochen. Zur Darstellung von PSD-95 ist zu bemerken, daß das Protein zusätzlich zu drei PDZ-Domänen (lila Kreise) mit einer SH3- (Src-Homologie-3-) und einer GK- (Guanylatkinase-verwandte-) Domäne (grüne und blaue Ovale) zwei weitere bekannte Protein-Protein-Interaktionsdomänen besitzt. Der N-Terminus verankert PSD-95 einerseits über eine Palmitoylgruppe (Zickzacklinie) in der Membran, ermöglicht daneben aber auch die Dimerisierung.

Außer mit NMDA-Rezeptoren geht PSD-95 auch Wechselwirkungen mit AMPA-Rezeptoren (indirekt über Stargazin [16]) und Kaliumkanälen (Kv1, Kir2, [48],[69]) ein.

zur Zeit etwa das in Abbildung 1 gezeigte Bild ihres Aufbaus. Eine herausragende Rolle in diesem komplexen Netzwerk von Interaktionen spielen Proteine mit sogenannten PDZ-Domänen, die typischerweise über kurze C-terminale Erkennungssequenzen an andere Proteine zu binden vermögen (Übersicht in [49]). PSD95, der Name steht für PSD-Komponente von 95 kDa, ist der bestuntersuchte Vertreter der PDZ-Proteine und nimmt zugleich eine Schlüsselstelle im Netzwerk der PSD ein, da es direkt an mehrere Transmembranproteine der Postsynapse bindet und dadurch als Adapter für deren Integration in die PSD fungiert. An NMDA-Rezeptoren bindet PSD95 über das C-terminale Motiv ES/TXV der NR2-Untereinheiten ([50], zum Aufbau von NMDA-Rezeptoren s. nächster Abschnitt). Die Funktion der PSD wird allgemein in der Verankerung der Neurotransmitterrezeptoren an der Synapse gesehen, daneben auch in der Regulation ihres Einbaus in die subsynaptische Membran sowie in der Rekrutierung weiterer Proteine, die Bestandteil der durch die Rezeptoren aktivierten Signalkaskaden sind. Im Fall der Wechselwirkung zwischen NMDA-Rezeptoren und PSD95 finden sich Hinweise auf alle diese Funktionen. Deletion des C-terminalen PSD95-Bindemotivs führt in kultivierten Neuronen zu einer verringerten Zahl synaptischer NMDA-Rezeptoren [85]. Ein Grund dafür könnte darin liegen, daß PSD95 die Internalisierung von NMDA-Rezeptoren verlangsamt [78]. Schließlich bindet PSD95 unter anderem die neuronale NO-Synthase (nNOS), die die Bildung von Stickstoffmonoxid katalysiert [18]. NO wiederum spielt im Nervensystem eine erst in neuerer Zeit erkannte neurotransmitterähnliche Rolle und scheint auch an einigen Arten der durch NMDA-Rezeptoren vermittelten Plastizität beteiligt zu sein (z. B. [9],[13]). Da nNOS durch Ca^{2+} aktiviert wird, wird angenommen, daß PSD95, indem es Ca^{2+} -leitende NMDA-Rezeptoren und Ca^{2+} -abhängige nNOS einander räumlich nahe bringt, die Effizienz der durch NMDA-Rezeptoren vermittelten Aktivierung des Enzyms erhöht [18].

Als weitere Aufgabe von PSD95 wird seit kurzem auch eine direkte Beeinflussung der Eigenschaften von Ionenkanälen diskutiert. Gezeigt werden konnte diesbezüglich bisher eine Reduktion der Einzelkanalleitfähigkeit des Kaliumkanals Kir2.3 [69].

Als Indizien einer direkten Wirkung von PSD95 auf die pharmakologischen Eigenschaften von NMDA-Rezeptoren können zwei veröffentlichte Befunde angesehen werden. Zum einen konnte gezeigt werden, daß Koexpression von PSD95 mit NMDA-Rezeptoren in *Xenopus*-Oozyten, den EC_{50} -Wert für Glutamat erhöht [99]. Zum anderen erhöht die Koexpression in HEK-Zellen den EC_{50} -Wert der Glutamatwirkung auf den Block von NMDA-Rezeptoren durch den Antagonisten MK-801 [81]. Von MK-801 wird angenommen, daß es spezifisch die Kanalpore offener Rezeptoren blockiert [42], entsprechend steigt mit zunehmender Glutamatkonzentration die Rate dieses Kanalblocks. Daß in Gegenwart von PSD95 höhere Glutamatkonzentrationen zum Erreichen derselben Blockierungsraten erforderlich sind, deutet also ebenfalls auf einen höheren EC_{50} für Glutamat hin. Da ein beinahe identischer Effekt auf die Glyzinabhängigkeit des MK-801-Blocks beobachtet wurde [80], ist spekuliert worden, daß PSD95 die Offenwahrscheinlichkeit von NMDA-Rezeptoren reduzieren könnte, was eine gleichzeitige Erhöhung der EC_{50} -Werte für Glyzin und Glutamat erklären würde [80].

6. NMDA-Rezeptoren sind tetramere Proteinkomplexe aus glutamat- und glyzinbindenden Untereinheiten

Die molekulare Natur ionotroper Glutamatrezeptoren konnte während der neunziger Jahre geklärt werden. Es handelt sich bei iGluRs um Proteinkomplexe aus aller Wahrscheinlichkeit nach vier Untereinheiten ([54],[79]), die um den zentralen Ionenkanal angeordnet sind.

Wie in Abbildung 2a schematisch dargestellt durchspannt jede Untereinheit die Membran dreimal (mit den Membrandomänen 1, 3 und 4), der N-Terminus liegt extra-, der C-Terminus intrazellulär. Zwei weiteren Strukturelementen kommt besondere Bedeutung zu: Membrandomäne 2, auch als *reentrant-loop* bezeichnet, bildet zusammen mit ihren Gegenstücken auf den drei anderen Untereinheiten den Ionenkanal. Die Membrantopologie der Untereinheiten erinnert an einen „invertierten“ Kaliumkanal (Abbildung 2c) und tatsächlich finden sich im Bereich

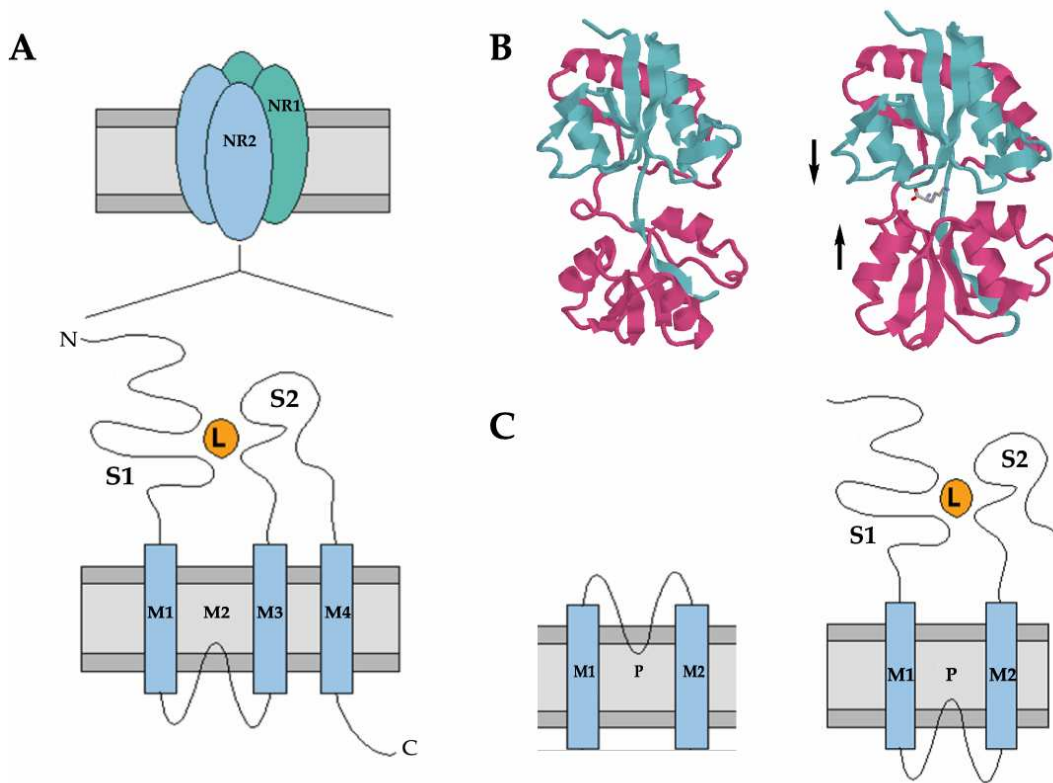


Abb. 2: Aufbau ionotroper Glutamatrezeptoren. A: Schematische Darstellung am Beispiel von NMDA-Rezeptoren. oben: Der tetramere Rezeptor besteht aus je zwei NR1- und NR2-Untereinheiten, die den Ionenkanal umschließen. unten: Membrantopologie einer Untereinheit mit den vier Membranregionen, von denen drei die Membran durchspannen. Der M2-loop trägt den Selektivitätsfilter des Ionenkanals. Die an die Membran angrenzenden extrazellulären Bereiche S1 und S2 bilden zusammen die Ligandenbindungsstelle der Untereinheit. B: Kristallstrukturen des Lysin/Arginin/Ornithin-Bindeproteins (LAOBP, [71]) aus *Salmonella typhimurium* als einem Vertreter der Familie der bakteriellen periplasmatischen Aminosäurebindepoteine, links: ohne (PDB-Eintrag: 2LAO), rechts: mit gebundenem L-Lysin (1LST). Aufgrund ihrer Homologie zur Ligandenbindungsdomäne der iGluRs können Strukturen dieser Proteinfamilie als Vorlage für Strukturmodelle von iGluRs benutzt werden. Der der S1-Domäne entsprechende Teil ist in blau, die S2-Domäne in rot dargestellt. Deutlich zu erkennen ist das Schließen der beiden Domänen um den zwischen ihnen liegenden Liganden, was zum Ausdruck Venusfliegenfallen-Mechanismus der Ligandenbindung geführt hat. C: Membrantopologie des Kaliumkanals KscA [29] aus *Streptomyces lividans* und des prokaryontischen iGluRs GluR0 [15] aus *Synechocystis sp.* Die Topologie eukaryontischer und prokaryontischer iGluRs ist verglichen mit KscA invertiert. Die zusätzliche vierte Membranregion sowie die anschließende C-terminale Domäne eukaryontischer iGluRs fehlt in GluR0, der deshalb und aufgrund seiner Selektivität für Kalium als Übergangsform zwischen Kaliumkanälen und den eukaryontischen iGluRs angesehen wird.

der Kanalregion Sequenz- und Funktionshomologien zu dieser Proteinfamilie ([72],[51]). Die als S1- und S2-Domänen bezeichneten extrazellulären Peptidabschnitte unmittelbar N-terminal der ersten Transmembrandomäne sowie zwischen Membrandomäne 3 und 4 bilden die Ligandenbindungsstelle. Anders als zum Beispiel in der nikotinischen Acetylcholinrezeptorfamilie trägt also jede iGluR-

Untereinheit eine vollständige Ligandenbindungsdomäne. Diese weist Sequenzhomologien zu einer Familie bakterieller periplasmatischer Bindeproteine auf [88], deren Kristall- und NMR-Strukturen (s. Abbildung 2b) die Basis für die ersten Strukturmodelle der Ligandenbindungsdomänen von iGluRs ([88],[52],[53]) bildeten. Evolutionär betrachtet kann der Ursprung der iGluRs aufgrund der Homologien im Bereich der Kanalregion und der Ligandenbindungsdomäne in der Verschmelzung eines Kaliumkanals mit einem löslichen Bindeprotein gesehen werden. Daß dieses Ereignis bereits sehr früh in der Entwicklungsgeschichte stattgefunden haben muß,

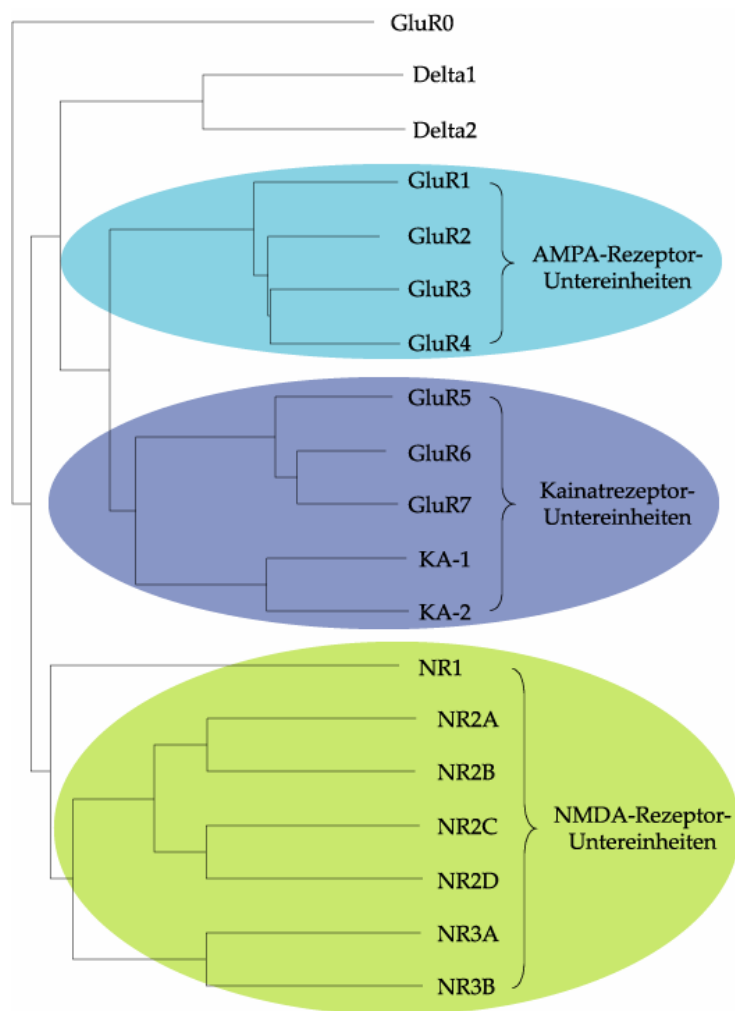


Abb. 3: iGluR-Untereinheiten. Der gezeigte Stammbaum stellt die Sequenzverwandschaft auf Proteinebene aller bekannten iGluR-Untereinheiten von Säugetieren dar. Zusätzlich enthält er mit Delta1 und Delta2 zwei sog. Waisenrezeptoren, für die kein Ligand bekannt ist. Ebenfalls gezeigt ist GluR0, ein prokaryontischer iGluR. Der Stammbaum wurde mit dem Programm ClustalX [93] erstellt. Die Länge horizontaler Linien ist dem Ausmaß auftretender Sequenzabweichungen proportional. Ein sehr ähnlicher Stammbaum findet sich in [70].

belegt die Existenz eines prokaryontischen iGluRs (GluR0, [15]), der allgemein als *missing link* auf dem Weg zu den iGluRs von Eukaryonten angesehen wird (Abbildung 2c) und dessen Ionenkanal selektiv für Kalium ist. Gewissermaßen in Umkehrung der Evolution ist es in jüngster Zeit gelungen, die Ligandenbindungsdomänen einiger iGluRs auf gentechnischem Weg getrennt von den Transmembran-domänen als lösliche Proteine herzustellen und ihre Kristallstrukturen zu bestimmen (s. I.6).

Die Klonierung und Sequenzierung der iGluR-Untereinheiten hat gezeigt, daß sich die ursprünglich pharmakologisch vorgenommene Unterteilung der iGluR-Familie, in NMDA- und Nicht-NMDA-Rezeptoren sowie letzterer in AMPA- und Kainatrezeptoren, in den molekularen Verwandtschaftsbeziehungen der Untereinheiten widerspiegelt (Abbildung 3). Ein weiterer Unterschied zwischen den Untergruppen besteht in der Kombination der Untereinheiten im Tetramer. Während die AMPA- und Kainatrezeptoruntereinheiten, GluR1-4 bzw. GluR5-7, sowohl homo- als auch heteromere Rezeptoren bilden können, sind homomere NMDA-Rezeptoren nicht bekannt. Normalerweise bilden hier zwei NR1-Untereinheiten ein Heteromer mit zwei NR2-Untereinheiten. Während nun die Bindungsstellen aller AMPA- und Kainatrezeptoruntereinheiten glutamatspezifisch und die aus ihnen gebildeten Rezeptoren stets allein durch Glutamat aktivierbar sind, binden in NMDA-Rezeptoren nur die beiden NR2-Untereinheiten Glutamat [53], die NR1-Untereinheiten hingegen Glyzin [52]. Einzigartig unter allen bekannten ligandengesteuerten Ionenkanälen benötigen NMDA-Rezeptoren damit die gleichzeitige Bindung zweier verschiedener Agonisten zur Aktivierung [24]. Glyzin, bekannt als inhibitorischer Neurotransmitter vor allem im Rückenmark, kann über seine Bindung an NMDA-Rezeptoren also auch exzitatorische Wirkung entfalten, wobei allerdings noch unklar ist, ob die Glyzinkonzentration an glutamatergen Synapsen gezielt reguliert wird, um die Aktivität von NMDA-Rezeptoren zu modifizieren. Über die erst kürzlich beschriebenen heteromeren Rezeptoren aus NR1- und NR3-Untereinheiten ([89],[70],[14]) ist zur Zeit noch recht wenig bekannt.

Die aufgrund ihrer molekularen Verwandtschaft (s. Abbildung 3) als NMDA-Rezeptoren bezeichneten Kanäle scheinen jedoch allein durch Glyzin, also glutamatunabhängig, aktivierbar zu sein [14].

7. Molekulare Betrachtung der Funktionsweise von iGluRs

Die Sequenzhomologie zwischen den Ligandenbindungsdomänen der iGluR-Untereinheiten und bakteriellen periplasmatischen Bindeproteinen wurde bereits angesprochen. Röntgenstrukturanalysen [71] haben ergeben, daß die Substratbindung in dieser Proteinfamilie einem konservierten Mechanismus folgt, bei dem sich die beiden Domänen des Proteins wie die Fangklappen einer Venusfliegenfalle um den zwischen ihnen gebundenen Liganden schließen (s. Abbildung 2b). Daß die Architektur der Ligandenbindungstasche zwischen den bakteriellen Proteinen und iGluRs tatsächlich, wie anhand der Sequenzhomologien zu vermuten, weitgehend konserviert ist, konnte am MPI für Hirnforschung durch umfangreiche Mutagenesestudien an den NMDA-Rezeptoruntereinheiten NR1 [52] und NR2B [53] belegt werden. Diese strukturelle Übereinstimmung führte zur Annahme, daß auch der Mechanismus der Bindung zwischen beiden Proteinfamilien konserviert sein könnte.

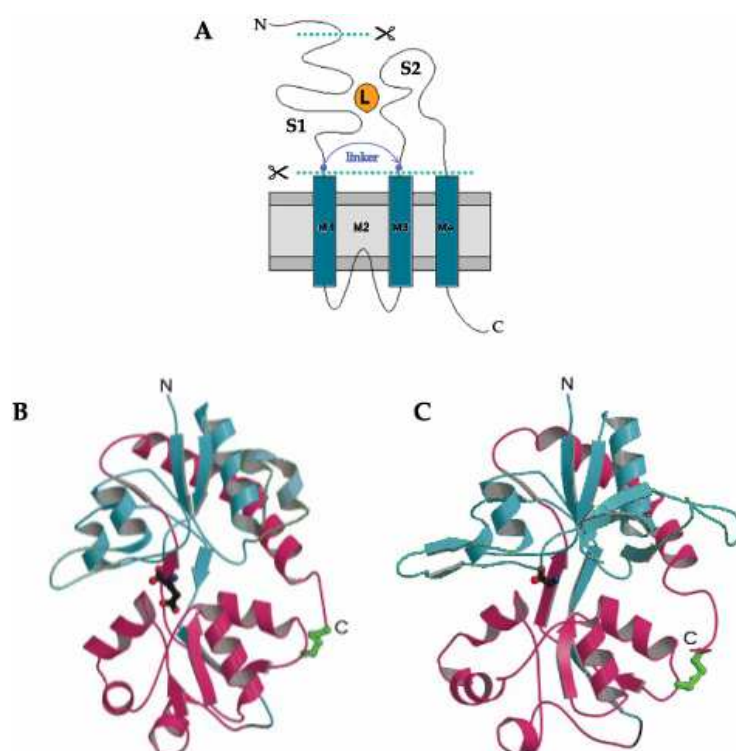


Abb. 4: Kristallstrukturen zweier iGluR-Untereinheiten. A: Aufbau der Untereinheiten und des kristallisierten Bereichs. Verwendet wurde ein lösliches Fusionsprotein der S1- und S2-Domänen, ohne die N-terminale Domäne sowie die Transmembrandomänen mit dem C-Terminus. Die beiden Teildomänen S1 und S2 sind über eine künstliche *linker*-Sequenz miteinander verknüpft. B und C (leicht verändert aus [64]): Strukturen der Fusionsproteine aus S1- (blau) und S2-Domäne (rot) von GluR2 (PDB-Eintrag: 1FTJ, [4]) und NR1 (1PB7, [35]) mit dem jeweiligen Liganden, L-Glutamat bzw. Glyzin. Bemerkenswert ist die Ähnlichkeit der Strukturen zum bakteriellen LAOBP (s. Abbildung 2b).

Bestätigt wurde dies durch die 1998 gelöste Struktur der Ligandenbindungsdomäne der AMPA-Rezeptoruntereinheit GluR2 ([6], Abbildung 4b) in An- und Abwesenheit des Liganden AMPA. Wie sich zeigte nimmt diese analog den bakteriellen Bindeproteinen ohne Ligand eine offene, mit jedoch eine geschlossene Konformation ein. Dieser ligandeninduzierte Konformationswechsel legt die Vermutung nahe, daß dieser Vorgang Teil des Prozesses der Kanalöffnung und das Schließen der Bindungsdomäne das mechanistische Bindeglied zwischen Ligandenbindung und Kanalöffnung sein könnte. Wesentliche Stützung erfährt diese Annahme durch zwischenzeitlich gelöste weitere Strukturen der Bindungsdomänen von GluR2 sowie der NMDA-Rezeptoruntereinheit NR1 (Abbildung 4c) in Gegenwart verschiedener Agonisten ([4],[45],[46],[35]), anhand derer sich eine Korrelation zwischen Agonisten-Effizienz und induziertem Schließungsgrad der Bindungsdomäne erkennen läßt (Abbildung 5). Führt man sich vor Augen, daß Röntgenstrukturen oft mittlere Strukturen verschiedener Konformere des Proteins darstellen, könnte diese Korrelation dadurch erklärt werden, daß effizientere Agonisten den geschlossenen Zustand der Bindungsdomäne stärker stabilisieren als weniger effiziente. Wenn man davon ausgeht, daß das Schließen der Bindungstasche zur Kanalöffnung erforderlich ist, würde dies direkt die unterschiedliche Potenz der Agonisten zur Rezeptoraktivierung erklären.

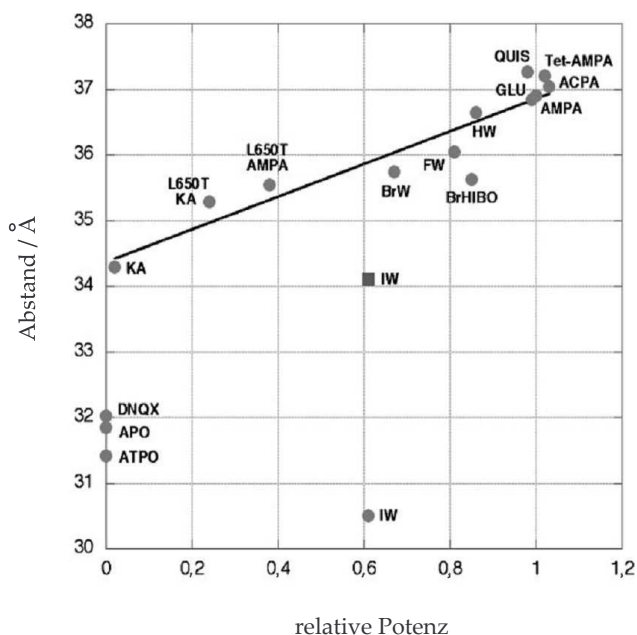


Abb. 5: Beziehung zwischen der Potenz verschiedener Agonisten und dem Grad, des durch sie induzierten Schließens der Bindungsdomäne von GluR2 (aus [64]). Die Daten basieren auf der Struktur der im Kristall als Dimer vorliegenden Bindungsdomäne. Die auf der Abszisse angegebenen Werte beziehen sich auf den Abstand zwischen den *linker*-Abschnitten der zwei Untereinheiten, der mit zunehmendem Schließen der Bindungsdomänen ansteigt (vgl. Abbildung 6). Die Potenz der verschiedenen Liganden als Agonisten ist relativ zu AMPA angegeben. Bei L650T handelt es sich um eine ebenfalls kristallisierte mutante Form von GluR2 [5], die durch AMPA und Kainat beinahe gleich stark aktiviert wird.

Die Tatsache schließlich, daß das lösliche GluR2-Konstrukt, anders als die bakteriellen Bindeproteine, als Dimer kristallisiert, hat zu einer plausiblen Hypothese darüber geführt, wie das Schließen der Bindungsdomäne in iGluRs an die Kanalöffnung gekoppelt sein könnte. In dem weitgehend mechanischen Modell (s. Abbildung 6) eines „Dimers aus Dimeren“ [7] stehen jeweils zwei Untereinheiten, wie in den Kristallstrukturen, über ihre S1-Domänen miteinander in Wechselwirkung. Die Interaktionsfläche verankert die S1-Domänen, sodaß das durch Bindung des Agonisten induzierte Schließen der Bindungsdomänen nur über eine entsprechende Bewegung der S2-Domänen erreicht werden kann. Dadurch entsteht mechanische Spannung im Bereich der Transmembranregionen, die letztlich zur Öffnung des Kanals führt [90].

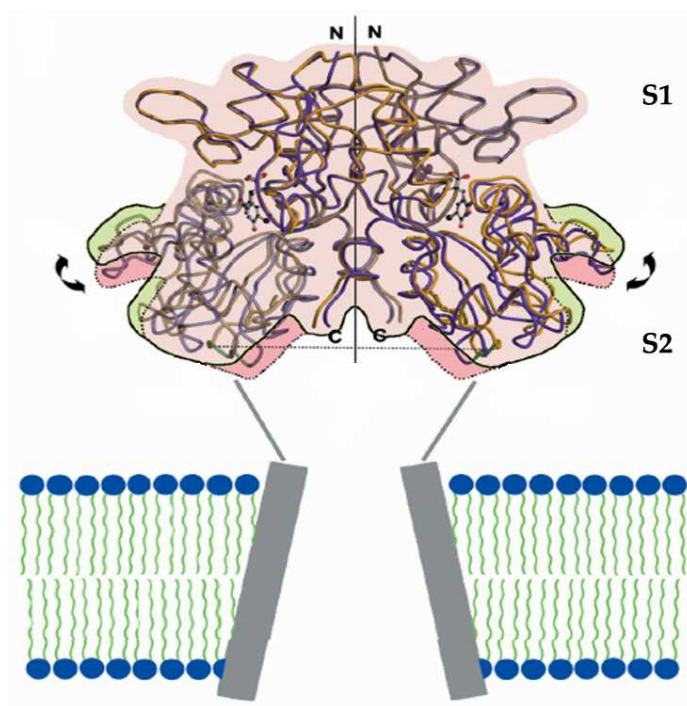


Abb. 6: Modellvorstellung zur Verbindung zwischen Ligandenbindung und Kanalöffnung in iGluRs basierend auf der Kristallstruktur von GluR2 (leicht verändert aus [45]). Gezeigt ist lediglich die funktionelle Einheit des Modells, ein Dimer zweier benachbarter Untereinheiten des tetrameren Rezeptors. Dieses Dimer wird über Wechselwirkungen seiner S1-Domänen stabilisiert, die damit relativ zueinander fixiert werden. Das Schließen der beiden Bindungsdomänen nach der Ligandenbindung kann deshalb nur über eine (aufwärts und nach außen gerichtete) Bewegung (Pfeile) der S2-Domänen erreicht werden. Dadurch wird mechanisch Zug auf die Transmembrandomänen ausgeübt, was schließlich zur Kanalöffnung führt.

Ob im Fall von NMDA-Rezeptoren die in diesem Modell postulierte dimere Funktionseinheit aus gleichen oder unterschiedlichen, also NR1- und NR2-Untereinheiten besteht, ist noch nicht abschließend geklärt. Das NR1-Konstrukt liegt im Kristall als Monomer vor [35], andererseits bildet ein ähnliches Konstrukt, das N-terminal weniger stark gekürzt ist, Dimere in Lösung [43]. Eine vor kurzem erschienene Arbeit [84] deutet zudem auf eine Anordnung der Untereinheiten in der

Form NR1-NR1-NR2-NR2 im tetrameren Rezeptor hin, womit zumindest, anders als für die Anordnung NR1-NR2-NR1-NR2, die Möglichkeit einer Wechselwirkung zwischen gleichen Untereinheiten bestünde. Unabhängig davon ist dem Modell der mechanischen Kopplung nach das Schließen der Bindungsdomäne aber entscheidend für die Kanalöffnung.

Allerdings macht das Modell keine Aussagen zur Kinetik der postulierten Teilschritte. So könnte das Schließen der Ligandenbindungsdomäne unmittelbar nach der Ligandenbindung in einem schnellen, die anschließende Kanalöffnung dagegen in einem langsamen Schritt erfolgen. In diesem Fall wäre die Konformationsänderung in der Bindungsdomäne kinetisch als Teilschritt der Ligandenbindung anzusehen, der Prozeß der Kanalöffnung dagegen würde in seiner Geschwindigkeit durch nachfolgende Umlagerungen im Bereich der Kanalregion bestimmt. Wenn dagegen der Schließvorgang in der Bindungsdomäne langsamer verläuft als die nachfolgenden Konformationsänderungen im Bereich des Ionenkanals, ist er kinetisch der Kanalöffnung zuzurechnen und für diese ratenlimitierend. Kinetische Daten zum Venusfliegenfallen-Mechanismus eines der bakteriellen Bindeproteine stützen eher die zweite Vorstellung. Die Schließrate nach Substratbindung wurde für das Galaktose-Glukose-Bindeprotein aus *E.coli* nämlich zu $10\text{-}1000\text{ s}^{-1}$ geschätzt [12]. Zwar ist dies eine sehr grobe Angabe, die Ratenkonstanten der Aktivierung von iGluRs (s. I.4) liegen aber am oberen Rand dieses Bereichs. Das paßt gut zur Vorstellung einer Ratenlimitierung der Kanalöffnung durch das Schließen der Bindungsdomäne. Wären dagegen Prozesse in der Kanalregion geschwindigkeitsbestimmend, müßten diese und damit die gesamte Rezeptoraktivierung nochmals deutlich langsamer erfolgen. Allerdings muß für diese Argumentation angenommen werden, daß die Kinetiken der Venusfliegenfallenbewegung in bakteriellen Bindeproteinen und iGluRs vergleichbar sind.

8. Projektvorstellung

Mutationen im Bereich der Ligandenbindungsdomäne, die die Kinetik der Kanalöffnung beeinflussen, wären ein guter Beleg dafür, daß Konformationsänderungen in der Bindungsdomäne tatsächlich ratenlimitierend für die Kanalöffnung sind. Bisher ist zwar für keine Mutation in iGluRs ein solcher Effekt belegt, in den im vorherigen Abschnitt erwähnten Mutagenesestudien an NMDA-Rezeptoruntereinheiten konnten jedoch mehrere Kandidaten-Mutationen identifiziert werden. Die Charakterisierung mutanter Rezeptoren erfolgte dort im wesentlichen anhand von Dosiswirkungskurven und ergab teils drastische EC_{50} -Änderungen als Folge einzelner Aminosäureaustausche (s. Tabelle 1). Dazu muß gesagt werden, daß der EC_{50} ligandengesteuerter Ionenkanäle nicht grundsätzlich als Maß der Affinität angesehen werden darf, sondern auch von der Offenwahrscheinlichkeit abhängt (s. Anhang B). EC_{50} -Bestimmungen sind also zwar experimentell einfach durchzuführen, erlauben aber keine klare Aussage über den einer Änderung zugrundeliegenden Mechanismus [21].

	EC_{50} (L-Glutamat) / μM		
NR2Bwt	1,5	\pm	0,6
E387A	355	\pm	74
K459E	270	\pm	68
H460A	703	\pm	41
K462A	87	\pm	24
S486A	65	\pm	17
R493K	n. f.	\pm	n. f.
N662A	79	\pm	17
S664G	177	\pm	64
T665A	743	\pm	198
D706N	n. f.	\pm	n. f.
Y736A	2860	\pm	560

Tab. 1: Punktmutationen in der NR2B-Untereinheit führen zu starken Verschiebungen des EC_{50} -Werts für L-Glutamat (Daten von B. Laube, teilweise veröffentlicht in [53]).

Der EC_{50} (\pm S.E.M.) von wt-NR1/NR2B-Rezeptoren ist dem verschiedener mutanter Rezeptoren gegenübergestellt. Punktmutationen sind wie auch im übrigen Text in Einbuchstabennotierung und in der Form wt-Rest, Position, mutanter Rest angegeben. So bedeutet E387A also eine Mutation von Glutamat an Position 387 zu Alanin. n. f.: nicht funktionell.

Der Vergleich mit Strukturmodellen der NR1- und NR2-Untereinheiten zeigte nun für viele der mutierten Reste eine direkte Wechselwirkung mit dem Liganden, was einen Affinitätsverlust der mutanten Rezeptoren als Ursache für die EC_{50} -Erhöhungen wahrscheinlich macht (Abbildung 7a).

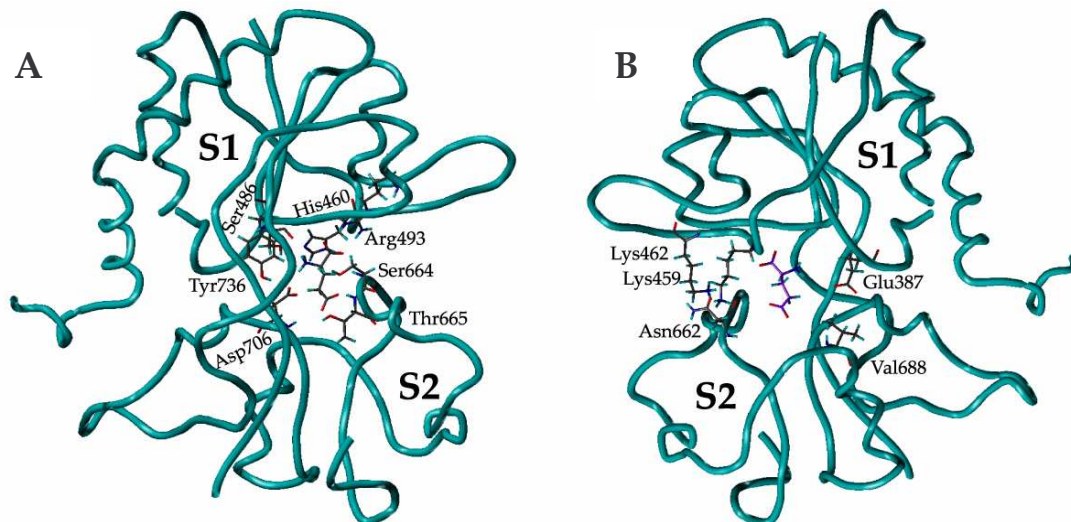


Abb. 7: Strukturmodell der Ligandenbindungsdomäne der NR2B-Untereinheit.

Das Modell basiert auf der Kristallstruktur des entsprechenden Bereichs in GluR2 (s. II.2.5.5). Zu erkennen ist die Gliederung in die Teilbereiche S1 (oben) und S2 (unten). Die AS-Reste aus Tabelle 1 lassen sich in zwei Gruppen unterteilen. **A:** Reste in unmittelbarer Nähe zum Liganden, die Wechselwirkungen mit diesem einzugehen scheinen. Serin 664 und Threonin 665 bilden über ihre Hydroxyl- und ihre NH-Gruppen Wasserstoffbrücken mit der α - bzw. γ -Carboxylgruppe des Liganden aus. Die α -Carboxylgruppe wird zudem durch Arginin 493 stabilisiert. Tyrosin 736, Serin 486 und Aspartat 706 binden die Ammoniumgruppe von Glutamat und Histidin 460 geht eine nicht-polare Wechselwirkung mit dem Kohlenwasserstoff-Grundgerüst des Liganden ein. **B:** Reste an Kontaktstellen zwischen den Teilbereichen S1 und S2. B ist gegenüber A um etwa 180° um die vertikale Achse gedreht. Lysin 459 sowie möglicherweise Lysin 462 bilden Wasserstoffbrücken mit Asparagin 662. Glutamat 387 liegt ebenfalls am Rand der S1-Domäne und scheint nicht mit dem Liganden zu interagieren. Eventuell könnte eine Wasserstoffbrückenbindung mit der NH-Gruppe von Valin 688 bestehen.

Für andere Reste ist eine direkte Beteiligung an der Ligandenbindung dagegen nicht ersichtlich (Abbildung 7b). Letztere finden sich auffälligerweise in Randbereichen der S1- und S2-Domänen, wo sie Wechselwirkungen mit der jeweils anderen Domäne eingehen und damit am Schließen der Ligandenbindungsdomäne beteiligt sein könnten. Die durch Mutation an diesen Positionen verursachte EC_{50} -Erhöhung könnte dem mechanischen Modell nach also Folge einer Beeinflussung der

Kanalöffnung sein. Die Rolle einiger dieser Reste, Glutamat 387, Lysin 459 und Asparagin 662, wurde in dieser Arbeit näher untersucht, daneben mit Histidin 460 auch ein mutmaßlich direkt an der Ligandenbindung beteiligter Rest. Aus technischen Gründen (bessere Expression in HEK-Zellen) wurde dabei mit NR1/NR2A- an Stelle von NR1/NR2B-Rezeptoren gearbeitet. Die in Tabelle 1 und Abbildung 7 gezeigten Reste und damit auch die hier untersuchten sind jedoch zwischen den beiden NR2-Subtypen ausnahmslos konserviert. Zu beachten ist lediglich, daß homologe Aminosäurereste an Positionen über 600 in NR2A um drei Positionen gegenüber NR2B verschoben sind. So entspricht Asn662 aus NR2B Asn665 in NR2A.

An an den entsprechenden Positionen mutierten Rezeptoren wurden kinetische Messungen durchgeführt, die es erlauben, die Ligandenbindungs- und Dissoziationsrate sowie die Öffnungs- und Schließrate des Kanals zu bestimmen, und damit sehr viel weitergehende Aussagen zum Effekt der Mutationen zu treffen als dies anhand von Dosiswirkungskurven möglich wäre. Erreicht wird dies, indem der Aktivierungsprozeß elektrophysiologisch bei so hoher Zeitauflösung verfolgt wird, daß sich die Ligandenbindung kinetisch von der nachfolgenden Kanalöffnung trennen läßt. Die hierfür nötige schnelle Ligandenzugabe, die schneller als Bindung und Kanalöffnung erfolgen muß, um diese Vorgänge nicht zu überlagern, wird dabei durch den Einsatz von Käfigverbindungen (*caged compounds*) gewährleistet, aus denen der Ligand photolytisch freigesetzt wird. Neben der experimentellen Durchführung wird im Methodenteil auch die Analyse der so gewonnenen Daten ausführlich erläutert. Einen Überblick über die Anforderungen an *caged compounds* allgemein, für die Verwendung an ligandengesteuerten Ionenkanälen sowie über speziell für Untersuchungen an NMDA-Rezeptoren in Frage kommende gibt Anhang C.

Die Ergebnisse identifizieren eindeutig Aminosäurereste in der Ligandenbindungsdomäne, deren Mutation die Kanalöffnung beeinflusst, und bieten interessante

Einblicke in die Wechselwirkungen zwischen Ligand und Bindungsdomäne sowie zwischen den Teildomänen S1 und S2.

Schließlich soll hier noch auf den Abschnitt Begriffsbestimmungen am Ende von Anhang B hingewiesen werden. Dort werden die Bedeutungen definiert, in denen einige in den weiteren Teilen der Arbeit wesentliche Ausdrücke aus dem Bereich der Rezeptoraktivierung gebraucht sind.

II. Material und Methoden

1. Molekular- und Zellbiologie

1.1 Zellen, Zellkulturmedien und Medienzusätze

HEK293T-Zellen	<i>human embryonal kidney</i> -Zellen (European Collection of Cell Cultures, ECACC)
FKS	fötales Kälberserum (HyClone)
DMEM+	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (GIBCO) mit 10% FKS und Streptomycin/Penicillin (100 U/ml / 100 µg/ml)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (GIBCO)
1x Trypsin	0,05% Trypsin, 0,53 mM EDTA aus 10x Stammlösung (GIBCO)
Fibronectin	Roche Diagnostics
D-AP5	D-2-Amino-5-phosphonopentansäure (Tocris)
MDL 105519	(E)-4,6-Dichloro-3-(2-phenyl-2-carboxyethenyl)-indol-2-carbonsäure (Sigma-Aldrich)

1.2 Kits

<i>Effectene</i> -Transfektionskit	Qiagen
<i>MaxiPrep</i> -DNA-Isolationskit	Qiagen
<i>MiniPrep</i> -DNA-Isolationskit	Qiagen
<i>QuikChange</i> -Mutagenesekit	Stratagene
<i>ABI Prism</i> DNA-Sequenzierungskit	Perkin-Elmer Applied Biosystems

1.3 Molekularbiologische Agenzien

Vektoren

<i>wt</i> NR1-Vektor	Spleißform 1a (NR1-1a, gi-Nummer: 8393483) aus Ratte im pCis-Expressionsvektor [38]
<i>wt</i> NR2-Vektoren	Isoformen 2A (gi-Nummer: 41680704) bzw. 2B (41680709) aus Maus in pCis
GFP-Kontrollvektor	<i>green fluorescent protein</i> im pGreenLantern-Expressionsvektor (GIBCO)

Mutageneseprimer

Mutagenese- und Sequenzierprimer (s.u.) wurden unter zu Hilfenahme der Software MacVector ausgewählt und durch MWG Biotech synthetisiert. Für die Mutageneseprimer ist jeweils nur der sense-Primer angegeben, dessen von der wt-Sequenz abweichende Basen hervorgehoben sind. Die zugehörigen antisense-Primer entsprechen jeweils genau den komplementären Sequenzen.

NR2A(E387A):	5'- CAG CAT TGT CAC CTT GGA <u>GGC</u> AGC CCC CTT CGT CAT CG -3'
NR2A(K459E):	5'- CCT GGT GAC CAA TGG <u>GGA</u> GCA TGG GAA AAA GG -3'
NR2A(K459N):	5'- CCT GGT GAC CAA TGG GAA <u>TCA</u> TGG GAA AAA GG -3'
NR2A(H460A):	5'- CTG GTG ACC AAT GGG AAG <u>GCG</u> GGG AAA AAG GTT AAC AAT GTG TGG -3'
NR2A(N665D):	5'- GGA CAG TAC <u>CCG</u> ATG GAA GTA CAG AAA GG -3'
NR2A(N665K):	5'- GGA CAG TAC CCA <u>AGG</u> GAA GTA CAG AAA GG -3'

Sequenzierprimer

Die Zahlen in den Primerbezeichnungen geben die Position des ersten Primernukleotids relativ zum verwendeten NR2Awt-Klon an.

NR2A(982sense):	5'- GAG ACC CCG CTA CAC ACT CTG CAC CAA TTT ATG G -3'
NR2A(1255sense):	5'- GTA GAA GAC ATA GAC CCA CTG ACT GAG ACC TGC G -3'

NR2A(1854sense): 5'- CGT CCA GAA TCC TAA AGG CAC AAC CAG C -3'
NR2A(2015sense): 5'- GAC CTC ATG ACT ATT CTC CGC CTT TCC GAT TTG G -3'

1.4 Ortsgerichtete Mutagenese

Mutante Formen der NMDA-Rezeptoruntereinheiten wurden mit Hilfe des *QuikChange* Mutagenesekits unter Verwendung der im vorigen Absatz angegebenen Primerkombinationen erzeugt. Die Methode basiert auf einer PCR-Amplifizierung der Ausgangs-DNA mit Primern, die, statt exakt mit den Ausgangssequenzen zu paaren, einen oder mehrere Nukleotidaustausche enthalten. Die Variablen des vom Hersteller empfohlenen PCR-Protokolls umfassen lediglich die Konzentration der Ausgangs-DNA und die Dauer der Elongationsphase jedes PCR-Zyklus (entsprechend der Größe der Ausgangs-DNA). Für Mutagenesen der NR1- und NR2-Vektoren wurden in dieser Arbeit stets 50 ng Ausgangs-DNA eingesetzt und die Dauer der Elongationsphase auf 16 min festgelegt. Nach Abschluß der Mutagenese-Reaktion wurden mit den Ansätzen wiederum nach Herstellerangaben kompetente *E.coli*-Zellen transformiert und aus diesen nach entsprechender Vermehrung die Plasmid-DNA im *Mini*-Maßstab aufgereinigt (s.u.).

1.5 Plasmidsequenzierung

Der Erfolg aller Mutagenese-Reaktionen wurde mittels Teilsequenzierung der erhaltenen Plasmide überprüft. Zu diesem Zweck wurde ein PCR-Verfahren basierend auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger [83] mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden verwendet. Der eingesetzte Sequenzierprimer bestimmt dabei den Startpunkt der Sequenzierung auf der Ausgangs-DNA. Alle verwendeten Sequenzierprimer sind im Materialteil aufgeführt. Das PCR-Protokoll für die Amplifizierungs-/Markierungsreaktion war in allen Fällen:

PCR-Ansatz:	Reaktionsbedingungen:			
400 ng Plasmid-DNA	30 s	95°C		
5 pmol Primer	30 s	95°C	}	40 Zyklen
4 µl Sequenziermix*	1 min	65°C		
ad 10 µl H ₂ O	2 min	72°C		

* aus Sequenzierungskit (enthält thermostabile Polymerase, Nukleotide und fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide)

1.6 Plasmidpräparation

Die Aufreinigung von Plasmiden erfolgte im *Mini*- (für Sequenzierungsreaktionen) oder *Maxi*-Maßstab (zur Gewinnung von Vektor-DNA für Transfektionen) mit den *Mini*- und *Maxi-Prep*-Kits nach Herstellerangaben.

1.7 Zellkultur

HEK293-Zellen wurden in DMEM+ bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die jeweilige Stammkultur wurde alle 3-4 Tage, d.h. vor Erreichen der Konfluenz, passagiert. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, der Zellrasen mit PBS gewaschen und mit 1x Trypsinlösung bedeckt (ca. 1 ml/25 cm²). Nach zwei- bis dreiminütiger Inkubation bei RT ließen sich die Zellen durch leichtes Klopfen vom Kulturflaschenboden ablösen. Der Trypsinverdau wurde durch Zugabe von 4 VT DMEM+ gestoppt und etwa 1/5 der Zellsuspension in eine neue Kulturflasche mit vorgelegten 4 ml/25 cm² Medium überführt. Zellen aus derart geführten Stammkulturen konnten in der Regel etwa 40 Passagen lang für elektrophysiologische Versuche verwendet werden.

1.8 Transiente Transfektion

Zur Untersuchung von NMDA-Rezeptoren im HEK-Zellsystem wurden die entsprechenden Rezeptoruntereinheiten transient exprimiert. Zu diesem Zweck wurde bei der Passage der Stammkultur (s.o.) ein Teil der nach dem Trypsinverdau erhaltenen Zellsuspension in 10 cm²-Kulturschalen mit fibronectinbeschichteten

(nach Herstellerangaben) Glasdeckgläschen und 2 ml vorgelegtem DMEM+ überführt. In der Regel wurde nur ein Tropfen der Zellsuspension verwendet, um eine ausreichende Verdünnung der Zellen zu erreichen. Dies ist wichtig, weil für die meisten elektrophysiologischen Messungen (s. 2.3) Einzelzellen benötigt wurden. Nach 24-stündiger Kultivierung wurden die Zellen mit den für die gewünschten Rezeptoruntereinheiten codierenden Plasmiden sowie dem GFP-Kontrollvektor transfiziert. Hierfür wurde das Effectene-Kit nach einem angepaßten Protokoll verwendet: pro zu transfizierendem 10 cm²-Schälchen wurden 0,05 µg GFP-Kontrollvektor mit 0,5 µg NR1- und entweder 1,5 µg NR2A- oder 0,75 µg NR2B-Vektor vermischt, mit 10 µl Enhancer-Lösung versetzt und zwei Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden 25 µl Puffer EB und, nach weiteren fünf Minuten, 12,5 µl Effectene zugegeben. Nach nochmals 10 min wurden 500 µl vorgewärmtes DMEM+ zupipettiert und der komplette Ansatz zügig mit dem bereits im Schälchen befindlichen Medium vermischt. Die Zellen wurden sodann 1 h 45 min lang unter Standardkulturbedingungen inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt, mit 2 ml PBS gewaschen und frisches Medium (DMEM+ mit 2 µM MDL und 200 µM – 1 mM D-AP5) zugegeben. Bei den genannten Zusätzen handelt es sich um kompetitive Inhibitoren der Glyzin- und der Glutamatbindung. Diese wurden eingesetzt, da während der anschließenden Kultivierung die Expression der NMDA-Rezeptormoleküle stattfindet und ihre Aktivierung durch im Medium enthaltenes Glutamat und Glyzin aufgrund des damit verbundenen Kalziumeinstroms toxisch auf die Zellen wirken würde.

2. Elektrophysiologie und Datenauswertung

2.1 Geräte

Minex Excimer Laser	Lambda Physik
Joulemeter	Gentech
Axopatch 200A	Axon Instruments
EPC-7, EPC-9	Adams&List

2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

caged Verbindungen

CNB-L-Glutamat, -NMDA, -D-Aspartat	Molecular Probes
CNB-Glyzin	zur Verfügung gestellt von Dr. Kyle Gee, Molecular Probes
NI-L-Glutamat	Sigma-Aldrich
MNI-L-Glutamat	Tocris
NI-Glyzin, NI-L-Aspartat	zur Verfügung gestellt von Dr. John Corrie, National Institute for Medical Research, London

Glaselektroden

wurden für whole cell-Messungen aus Borosilikatglas-Kapillaren (Clark Electromedical) mit $1,5 \times 1,17$ mm (Außen- \times Innendurchmesser) zu Widerständen von 1,5-3 M Ω gezogen. Für Einzelkanalmessungen wurden Kapillaren mit $1,5 \times 0,75$ mm (World Precision Instruments) zu Widerständen von 8-12 M Ω gezogen.

2.3 Lösungen für Elektrophysiologie

whole cell-Messungen

extrazelluläre Lösung	140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,85 mM CaCl ₂ and 10 mM HEPES, pH 7,4 (mit NaOH eingestellt)
intrazelluläre Lösung	145 mM KCl, 10 mM EGTA and 10 mM HEPES, pH 7,4 (mit KOH eingestellt)

Einzelkanalmessungen

Badlösung („interne“ Lösung)	141 mM K-Gluconat, 2,5 mM NaCl, 11 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7,4 (mit KOH eingestellt)
------------------------------	---

Pipettenlösung („externe“ L.) 125 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,25 mM NaH₂PO₄, 0,85 mM CaCl₂, 20 mM HEPES und Agonisten (100 nM Glutamat, 20 µM Glyzin), pH 7,4 (mit NaOH eingestellt)

2.4 Elektrophysiologische Methoden

2.4.1 *whole cell*-Messungen

Whole cell-Messungen erfolgten, soweit nicht anders angegeben, bei -60 mV Haltespannung. Die Ströme wurden mit 5-10 kHz (low pass) gefiltert und mit einer Abtastrate von 12 kHz digitalisiert. Die verwendeten Glasspipetten hatten Widerstände zwischen 1,5 und 3 MΩ.

2.4.2 *whole cell*-Messungen mit Lösungswechsel

Lösungswechsel erfolgten unter Verwendung eines druckluftgetriebenen Systems. Die jeweilige zu messende Zelle wurde dazu in der *whole cell*-Konfiguration durch leichte Bewegungen der Glaselektrode vom Deckglas abgelöst und in einer Entfernung von etwa 500 µm vor dem aus einem Quarzglasröhrchen bestehenden Lösungsausfluß positioniert. Dieser war über einen Verteiler aus Plexiglas mit sieben Lösungszuflüssen in Form von Kunststoffschläuchen (ϕ 0,5 mm) verbunden. Über mit Klebstoff abgedichtete Bohrlöcher in den Deckeln waren die Lösungs- sowie die Druckluft leitenden Schläuche in Eppendorff-Gefäße mit den entsprechenden Lösungsvorräten eingeführt. In Kombination mit elektronisch ansteuerbaren Ventilen zum Abklemmen einzelner Lösungsschläuche erlaubte dieses System den Wechsel zwischen bis zu sieben verschiedenen Lösungen. Über einen achten ebenfalls mit dem Verteiler verbundenen und über ein Ventil kontrollierbaren Schlauch war eine Pumpe an die Lösungswechselvorrichtung angeschlossen. Zwischen einzelnen Messungen wurde das System in der Konfiguration Pumpenventil auf, Ventil für gewünschte Lösung auf gehalten, was zu einer Äquilibration der Mischkammer im Verteiler mit der neuen Lösung führt, aber ein Ausströmen der Lösung noch verhindert (s. Abbildung 8a). Zu Beginn der Messung

wurde softwaregesteuert das Pumpenventil geschlossen und der Lösungsfluß dadurch von der Pumpe in den Lösungsausfluß umgelenkt (Abbildung 8b). Aus den

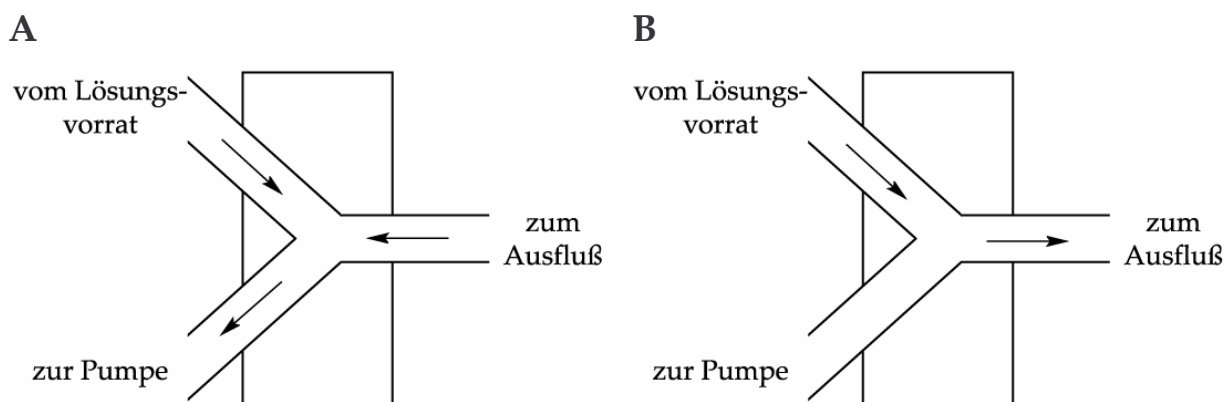


Abb. 8: Lösungsfluß durch die Mischkammer vor und während der Messung.

A: bei offenem Pumpenventil wird die Lösung aus dem Vorrat über die Mischkammer abgesaugt, kann aber bei entsprechender Einstellung der Pumpstärke nicht zum Ausfluß gelangen. Das System wird in dieser Konfiguration bereits bis zur Mischkammer mit der gewünschten Lösung äquilibriert. **B:** durch Schließen des Pumpenventils wird die Lösung direkt vom Vorrat zum Ausfluß umgeleitet.

resultierenden Stromantworten konnte abgeleitet werden, daß diese Anordnung einen vollständigen Lösungswechsel, d.h. die vollständige Verdrängung des die Zelle umgebenden Lösungsvolumens durch die applizierte Lösung, in etwa 100-200 ms erlaubte.

2.4.3 *whole cell*-Messungen mit hoher zeitlicher Auflösung durch Photolyse von *caged* Verbindungen

Handhabung und Lagerung von caged Verbindungen

Da *caged* Verbindungen in wäßrigen Lösungen spontaner Hydrolyse unterliegen, wurden in lyophilisierter Form erhaltene Verbindungen in Methanol gelöst, gebrauchsfertig aliquotiert und nach Entfernung des Methanols unter Vakuum bei -20°C gelagert. Einzelne Aliquots wurden erst unmittelbar vor Verwendung in der gewünschten Endkonzentration in Puffer gelöst. Die von Dr. John Corrie zur Verfügung gestellten Substanzen (NI-Glyzin und NI-L-Aspartat) wurden als konzentrierte wäßrige Lösungen erhalten und in dieser Form bei -80°C aufbewahrt.

Abbildung 9 zeigt die Strukturformeln der in dieser Arbeit verwendeten *caged compounds*.

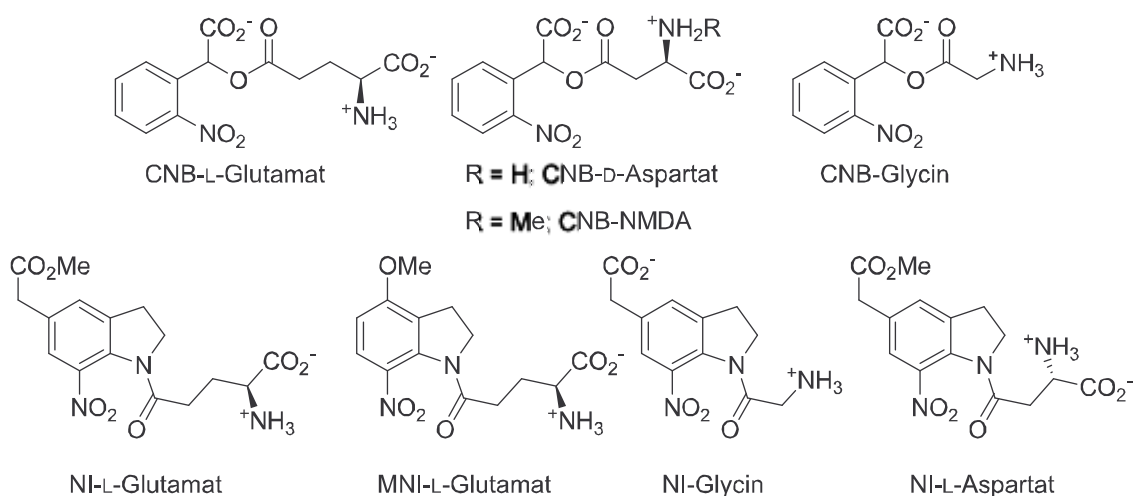


Abb. 9: Strukturformeln der verwendeten Käfigverbindungen.

Applikation von caged Liganden und photolytische Freisetzung

Die Applikation von caged Liganden erfolgte ebenso wie die freier Liganden mittels des oben beschriebenen Lösungswechselsystems (s. 2.3.1). caged Liganden der Glutamat- oder der Glyzinbindungsstelle wurden zusammen mit freiem Liganden der jeweils anderen Bindungsstelle drei Sekunden lang vorappliziert, bevor die caging-Gruppe durch einen Laserblitz abgespalten wurde. Zu diesem Zweck wurde rechtwinklig zum Lösungsausfluß und in etwa 300 µm Entfernung zur Zelle eine 365 µm dicke Glasfaser positioniert, auf deren anderes Ende über ein Linsensystem das Licht ($\lambda = 345$ nm) eines XeCl-Excimerlaser ($\lambda = 308$ nm)-gepumpten Farbstofflasers (mit p-Terphenyl in Dioxan als Farbstoff) gebündelt wurde und die dieses Licht auf die Zelle und ihre Umgebung leitete. Die Meßanordnung mit einer Zelle in *whole cell*-Konfiguration zwischen Lösungsausfluß und Lichtleiter ist in Abbildung 10 gezeigt.

Die Lichtintensität und damit die freigesetzte Menge der Liganden wurde durch Einbringen neutraler Dichtefilter in den Weg des Lichtstrahls zwischen Excimer- und

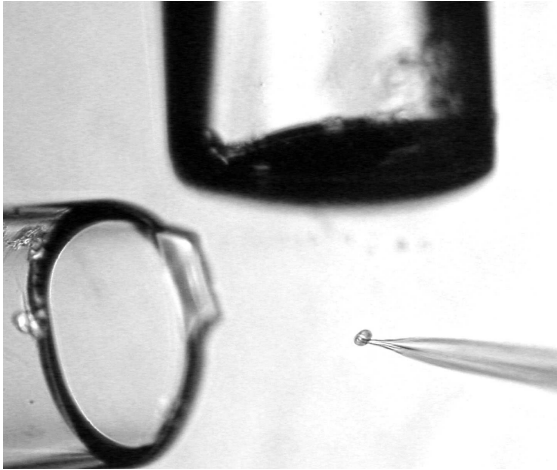


Abb. 10: Meßanordnung zur Applikation von *caged compound*-haltigen Lösungen, zur photolytischen Freisetzung des Liganden und Messung der Stromantwort.

Links unten ist das der Lösungszufuhr dienende Glasröhrchen zu sehen. Am oberen Bildrand befindet das Ende der Glasfaser, die als Lichtleiter benutzt wurde. Mittig zwischen beiden ist die zu messende HEK293-Zelle auf der Spitze der Glaselektrode zu erkennen.

Farbstofflaser kontrolliert. Typische unter Verwendung eines Joulemeters bestimmte Energiedichten lagen zwischen 50 und 400 mJ/cm².

2.4.4 Einzelkanalmessungen

Einzelkanalmessungen an NR1/NR2Awt- und NR1/NR2A(N665D)-Rezeptoren wurden in der *inside-out*-Konfiguration [41] bei einer Haltespannung von 100 mV durchgeführt. Pipetten für Einzelkanalmessungen hatten Widerstände zwischen 8 und 12 MΩ. Die Messungen erfolgten bei konstanten Konzentrationen von Glutamat (100 nM) und Glyzin (20 μM), die der Pipettenlösung zugesetzt waren. Ströme wurden bei 10 kHz gefiltert und mit 48 kHz auf digitale Audiobänder aufgezeichnet. Zur Auswertung wurden die Daten von Band wiedergegeben und mit 10 kHz Abtastrate digitalisiert. Die Festlegung von Öffnungs- und Schließereignissen erfolgte mit Hilfe der Software TAC (Instrutech), die auch zur Bestimmung der Einzelkanalleitfähigkeiten benutzt wurde. Zur weiteren Analyse wurde das pStat-Modul der pClamp-Software (Version 6.0, Axon Instruments) verwendet. Dazu wurden die Ereignisse nach ihrer Dauer in logarithmischem Maßstab mit 10 Klassen pro Größenordnung klassifiziert. An die so erstellten Histogramme wurden Summen von Exponentialfunktionen mittels der *Maximum Likelihood*-Methode [22] angepaßt, wobei die Zahl der Komponenten der Literatur ([87], s. auch III.4) entnommen wurde.

2.5 Datenauswertung

2.5.1 Bestimmung der in Photolyseexperimenten freigesetzten

Ligandenkonzentration

Die Ligandenkonzentration wurde in den Photolyseexperimenten wie oben beschrieben (s. 2.4.3) durch die Verwendung optischer Filter zur Abschwächung der Laserenergie variiert. Entsprechend dem Lambert-Beerschen Gesetz als $I = I_0 \cdot e^{-kd}$, in dem I_0 die Lichtintensität vor und I die Intensität nach dem Durchgang durch den Filter bezeichnet, sollte die verbleibende Laserenergie bei gleicher Filterschichtdicke d exponentiell mit dem Extinktionskoeffizienten k der verwendeten Filter abnehmen. Die absolute Lichtintensität läßt sich darüber hinaus auch direkt mit Hilfe eines Joulemeters ermitteln. Wiederholte Messung ($n=13$) der Lichtintensitäten nach Durchgang durch die verschiedenen verwendeten Filter ergab jedoch zum Teil nicht vernachlässigbare Abweichungen vom exponentiellen Zusammenhang des Lambert-Beer-Gesetzes. Neben Ungenauigkeiten in den Filterstärken dürfte hierfür die Versuchsanordnung selbst verantwortlich sein, in der wie zuvor beschrieben (2.4.3) die optischen Filter zwischen Excimer- und Farbstofflaser eingebracht wurden. Bei hohen Filterstärken führt das zu signifikanter Abweichung vom Lambert-Beer-Gesetz, weil die zum Pumpen des Farbstofflasers benutzte Lichtenergie nicht mehr zur Herstellung ausreichender Besetzungsinversion im Farbstoff ausreicht, so daß der Großteil der Photonen, anstatt die Emission zu induzieren, absorbiert wird.

Aus den beobachteten Abweichungen wurde die nachfolgende Korrekturtabelle erstellt. Sie gibt die prozentualen Abweichungen der Lichtintensitäten wieder, die mit den in dieser Arbeit verwendeten Filtern und Filterkombinationen auftreten.

Zusammen läßt sich also aus der Messung der absoluten Laserenergie, dem Lambert-Beerschen Gesetz und der Korrekturtabelle die im jeweiligen Experiment eingesetzte Lichtintensität ermitteln. Prinzipiell sollte sich die Menge des freigesetzten Liganden, und damit auch die Ligandenkonzentration, proportional zur Laserenergie verhalten. Der Proportionalitätsfaktor wurde anhand des aus Lösungswechsel-

versuchen bekannten EC_{50} -Wertes der NR1/NR2A-Untereinheitenkombination für Glutamat unter der Annahme bestimmt, daß derselbe Wert den Photolysedaten zugrunde liegt.

Filter	Abweichung / %
0	7,949
0,1	-3,692
0,2	-1,340
0,3	-1,832
0,4 (0,3 + 0,1)	-13,654
0,5	3,979
0,5 (0,3 + 0,2)	-11,527
0,6 (0,5 + 0,1)	-3,758
0,7 (0,5 + 0,2)	-4,996
0,8 (0,5 + 0,3)	-13,999
0,9 (0,5 + 0,3 + 0,1)	-27,583
1,0	-25,736
1,1 (1,0 + 0,1)	-50,339
1,2 (1,2 + 0,2)	-67,197

Tab. 2: Beobachtete Abweichungen verschiedener Filter und ihrer Kombinationen von ihren nominellen Stärken.

In der Spalte Filter sind die Nennwerte der getesteten Filterstärken als dekadische Extinktionskoeffizienten aufgeführt. Sofern es sich um Kombinationen verschiedener Filter des Filtersatzes handelt, sind die Stärken der Einzelfilter in Klammern angegeben.

In der Spalte Abweichung ist die prozentuale Abweichung der mit den Filtern erhaltenen Lichtintensität vom aus dem Extinktionskoeffizienten errechneten Erwartungswert angegeben.

2.5.2 Vergleich von Stromamplituden aus Lösungswechsel- und Photolyseexperimenten

Bei jeder Messung im *whole cell*-Modus liegt während der Aktivierungsphase, d.h. während der ansteigenden Phase der Stromantwort, ein Gemisch aus Rezeptoren in verschiedenen Zuständen vor. Unter anderem werden einige Rezeptoren bereits vor Erreichen des makroskopischen Spitzenstroms desensibilisieren. Die im Vergleich zu Photolyseexperimenten langsamere Ligandenapplikation in Lösungswechselversuchen bedingt ein späteres Erreichen des Maximalstroms und damit ein größeres Ausmaß an Desensibilisierung bis zu diesem Zeitpunkt. Sollen daher Stromamplituden aus diesen zwei verschiedenen experimentellen Ansätzen miteinander verglichen werden, muß die unterschiedlich weit fortgeschrittene Desensibilisierung berücksichtigt werden, weil sie allein bereits zu einem kleineren Maximalstrom im Lösungswechselexperiment führt. Zur Korrektur von Strömen um den Einfluß der

Desensitisierung wurde ein Verfahren verwendet, das bereits 1987 erstmals beschrieben wurde [95]. Es handelt sich um ein Näherungsverfahren, bei dem der Stromverlauf in kleine, konstante Zeitintervalle unterteilt wird, und die Korrektur intervallweise nach der Formel

$$I_{\text{korr}} = (e^{\alpha \Delta t} - 1) \sum (I_{\text{obs}}) \Delta t_i + (I_{\text{obs}}) \Delta t_n$$

erfolgt. $(I_{\text{obs}}) \Delta t_i$ ist dabei der beobachtete Strom am Ende des i -ten Zeitintervalls der Länge Δt , und α die Ratenkonstante der Desensitisierung, die unabhängig aus der Desensitisierungsphase des Stromverlaufs bestimmt werden muß. Bei Wahl eines ausreichend kleinen Wertes für Δt liefert die Funktion den korrigierten Strom am Ende des n -ten Zeitintervalls. Durch Berechnung der Funktionswerte für genügend viele Werte von n ist es möglich, die um Desensitisierung bereinigte Stromkurve darzustellen.

Wie sich bei Anwendung des Verfahrens auf in dieser Arbeit gewonnene Daten zeigte, beträgt die desensitisierungsbedingte Verringerung des Maximalstroms in Lösungswechselexperimenten im Mittel lediglich etwa 6%. Dies liegt zum einen an der relativ langsamen und unvollständigen Desensitisierung von NMDA-Rezeptoren. Typische Ströme weisen Ratenkonstanten der Desensitisierung im Bereich von $10\text{-}50\text{ s}^{-1}$ und eine nicht desensitisierende Komponente von etwa 70-80% des Gesamtstroms auf. Zum anderen ist das verwendete Lösungswechselsystem recht schnell (s. 2.3.1). Dennoch erwies sich der Effekt in einigen Fällen, in denen exakte Vergleiche von Photolyse- und Lösungswechselversuchen nötig waren, als nicht vernachlässigbar.

2.5.3 Kinetische Analyse von Photolysedaten

Zugrundeliegendes kinetisches Modell

Die äußerst schnelle photolytische Freisetzung von Liganden aus ihren Vorstufen ermöglicht eine Beobachtung des intrinsischen Zeitverlaufs der Rezeptoraktivierung. Um aus diesem Zeitverlauf weiterführende kinetische Aussagen ableiten zu können,

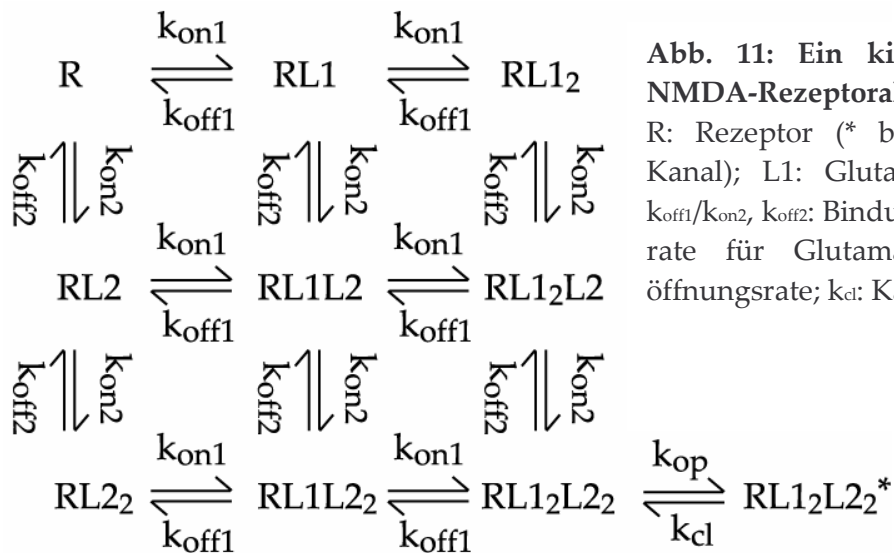


Abb. 11: Ein kinetisches Modell der NMDA-Rezeptoraktivierung.

R: Rezeptor (* bezeichnet den offenen Kanal); L1: Glutamat; L2: Glyzin; $k_{\text{on}1}$, $k_{\text{off}1}/k_{\text{on}2}$, $k_{\text{off}2}$: Bindungs- und Dissoziationsrate für Glutamat/Glyzin; k_{op} : Kanalöffnungsrate; k_{cl} : Kanalschließrate.

ist es zusätzlich nötig einige Annahmen über die zugrundeliegenden molekularen Prozesse zu machen. Diese Annahmen führen zu einem kinetischen Modell der Rezeptoraktivierung, von dem ausgehend die Analyse der Meßdaten erfolgt. Der wohl einfachste vorstellbare Mechanismus der Aktivierung eines liganden-gesteuerten Ionenkanals ist der del Castillo-Katz-Mechanismus, der in Anhang B beschrieben ist. Er enthält die beiden essentiellen Schritte der Ligandenbindung und der Kanalöffnung. Dieses Modell muß zumindest zu dem in Abbildung 11 dargestellten erweitert werden, um dem heutigen Kenntnisstand über die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren Rechnung zu tragen.

Das erweiterte Modell berücksichtigt, daß zur NMDA-Rezeptoraktivierung die Bindung von je zwei Molekülen sowohl des Agonisten (physiologisch Glutamat) als auch des Koagonisten (physiologisch Glyzin) an den tetrameren Rezeptor notwendig ist. Dieses minimale Modell enthält zwei vereinfachende Annahmen: zum einen wird davon ausgegangen, daß die Ratenkonstanten der Ligandenbindung unabhängig davon sind, ob bereits andere Ligandenmoleküle gebunden sind, daß also keine Kooperativität der Bindungsstellen besteht. Zum anderen wird vorausgesetzt, daß der vollständig ligandierte Rezeptor in einem einzigen Schritt vom geschlossenen in den offenen Zustand übergeht. Inwieweit diese Annahmen zulässig sind, bzw. welche Auswirkungen sie auf die Ergebnisse haben, wird im Diskussionsteil ausführlich untersucht. Das Modell enthält außerdem keinen Desensitisierungs-

schritt. Bei der verwendeten Meßmethode wird die Stromantwort durch eine einmalige Freisetzung des Liganden aus seiner Vorstufe induziert. Diese Freisetzung erfolgt im belichteten Bereich der Badlösung der aufgrund der Dicke der Lichtleitfaser (365 µm, 2.4.3) deutlich größer als der Durchmesser der gemessenen Zelle ist. Da aber zur Vermeidung von Meßartefakten, der Lösungszufluß während der Messung aktiviert blieb, nimmt die Konzentration des Liganden nach einer anfänglichen Verzögerung (ca. 70 ms) dennoch schnell ab. Um eine Überlagerung der Rezeptorantwort durch den Stromabfall in Folge abnehmender Ligandenkonzentration auszuschließen, wurden maximal die ersten 40 ms der Messungen bei der Auswertung berücksichtigt. Die Desensibilisierung könnte damit jedoch nur so unzureichend analysiert werden, daß die desensibilisierende Phase, die vor allem bei hohen Ligandenkonzentrationen noch während der ersten 40 ms einsetzt (vgl. III.2.1, Abbildung 19), ebenfalls von der Auswertung ausgeschlossen wurde.

Verwendung des Modells zur Interpretation der Meßergebnisse

Die mathematische Repräsentation des Modells (Abbildung 12) enthält mit den Konzentrationen der beiden Liganden lediglich zwei experimentell festlegbare

$$\begin{aligned}
d[R] / dt &= -2 * k_{on1} * [R] * [L1] + k_{off1} * [RL1] - 2 * k_{on2} * [R] * [L2] + k_{off2} * [RL2] \\
d[RL1] / dt &= 2 * k_{on1} * [R] * [L1] - k_{off1} * [RL1] - k_{on1} * [RL1] * [L1] + 2 * k_{off1} * [RL1_2] - 2 * k_{on2} * [RL1] + k_{off2} * [RL1L2] \\
d[RL1_2] / dt &= k_{on1} * [RL1] * [L1] - 2 * k_{off1} * [RL1_2] - 2 * k_{on2} * [RL1_2] * [L2] + k_{off2} * [RL1_2L2] \\
d[RL2] / dt &= -2 * k_{on1} * [RL2] * [L1] + k_{off1} * [RL1L2] - k_{on2} * [RL2] * [L2] + 2 * k_{off2} * [RL2_2] - k_{off2} * [RL2] + 2 * k_{on2} * [R] * [L2] \\
d[RL1L2] / dt &= 2 * k_{on1} * [RL2] * [L1] - k_{off1} * [RL1L2] + 2 * k_{off1} * [RL1_2L2] - k_{on1} * [RL1L2] * [L1] + 2 * k_{on2} * [RL1] * [L2] - k_{off2} * [RL1L2] \\
&\quad - k_{on2} * [RL1L2] * [L2] + 2 * k_{off2} * [RL1L2_2] \\
d[RL1_2L2] / dt &= k_{on1} * [RL1L2] * [L1] - 2 * k_{off1} * [RL1_2L2] + 2 * k_{on2} * [RL1_2] * [L2] - k_{off2} * [RL1_2L2] - k_{on2} * [RL1_2L2] * [L2] + 2 * k_{off2} * [RL1_2L2_2] \\
d[RL2_2] / dt &= -2 * k_{on1} * [RL2_2] * [L1] + k_{off1} * [RL1L2_2] + k_{on2} * [RL2] * [L2] - 2 * k_{off2} * [RL2_2] \\
d[RL1L2_2] / dt &= 2 * k_{on1} * [RL2_2] * [L1] - k_{off1} * [RL1L2_2] - k_{on1} * [RL1L2_2] * [L1] + 2 * k_{off1} * [RL1_2L2_2] + k_{on2} * [RL1L2] * [L2] - 2 * k_{off2} * [RL1L2_2] \\
d[RL1_2L2_2] / dt &= k_{on1} * [RL1L2_2] * [L1] - 2 * k_{off1} * [RL1_2L2_2] + k_{on2} * [RL1_2L2] * [L2] - 2 * k_{off2} * [RL1_2L2_2] - k_{op} * [RL1_2L2_2] + k_d * [RL1_2L2_2^*] \\
d[RL1_2L2_2^*] / dt &= k_{op} * [RL1_2L2_2] - k_d * [RL1_2L2_2^*] \\
I_{obs}(t) &= I_{max} * [RL1_2L2_2^*](t) / R_{Ges}
\end{aligned}$$

Abb. 12: Umsetzung des kinetischen Modells in ein System von Differentialgleichungen.

Die verwendeten Bezeichnungen und Symbole entsprechen denen in Abbildung 11. Die letzte Zeile setzt über den Skalierungsfaktor I_{max} den Anteil offener Rezeptoren an der Gesamtpopulation zum beobachteten Strom I_{obs} in Beziehung.

Variable. Die einzige der Beobachtung zugängliche Größe des Modells ist die Funktion $I_{obs}(t)$, der Strom, der durch die Population der offenen Rezeptorkanäle getragen wird und dieser in der Größe proportional ist. Der Weg, aus den

Meßergebnissen kinetische Parameter zu bestimmen, besteht darin, aus dem Modell theoretisch zu erwartende Stromkurven $I_{\text{theor}}(t)$ bei verschiedenen Ligandenkonzentrationen zu errechnen und diese mit den tatsächlich gemessenen $I_{\text{obs}}(t)$ zu vergleichen. $I_{\text{theor}}(t)$ ist dabei abhängig von den Parametern des Modells, also von den Ratenkonstanten k_{on1} , k_{off1} , k_{on2} , k_{off2} , k_{op} und k_{cl} . Die Werte dieser Parameter werden systematisch variiert bis die bestmögliche Übereinstimmung zwischen $I_{\text{theor}}(t)$ und $I_{\text{obs}}(t)$ bei allen verwendeten Ligandenkonzentrationen erzielt wird. Die Realisierung dieser Vorgehensweise erfolgte mit der Software Berkeley Madonna (Version 8.0.1, Macey&Oster). Diese benutzt zur Berechnung von $I_{\text{theor}}(t)$ aus dem System von Differentialgleichungen ein numerisches Näherungsverfahren (hier: Runge-Kutta 4. Ordnung), zur Parameteroptimierung die Methode der kleinsten Quadrate mit dem Minimierungsalgorithmus nach Levenberg-Marquardt. Die Umsetzung des verwendeten kinetischen Modells in die Skriptsprache des Programms findet sich in Anhang E. Die Daten jeder Zelle wurden getrennt analysiert und die Ergebnisse anschließend gemittelt.

2.5.4 Statistik

Signifikanzniveaus wurden in allen Fällen mit dem Student-t-Test (wenn nicht anders angegeben: zweiseitiger Test, ungepaarte Stichproben) errechnet. Sofern p-Werte im Text nicht explizit angegeben sind, bedeutet „signifikant“ $0,05 > p > 0,01$, „hochsignifikant“ $p < 0,01$. Alle Fehlerangaben sind Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.).

2.5.5 Berechnung der Strukturmodelle

Soweit nicht ausdrücklich erwähnt liegen sämtlichen in dieser Arbeit gezeigten Proteinstrukturen von Dr. Rudolf Schemm erstellte Strukturmodelle der Bindungstaschen der NR2A- und NR2B-Untereinheiten mit gebundenem L-Glutamat zugrunde. Diese Modelle wurden wie für NR2B beschrieben [97] auf Basis der publizierten Kristallstruktur der AMPA-Rezeptoruntereinheit GluR2 mit gebun-

denem L-Glutamat (PDB-Nr. 1FTJ, [4]) unter Verwendung der Software Sybyl 6.91 (Tripos Inc.) erzeugt.

Sybyl wurde ebenfalls zur Generierung der hier verwendeten Strukturmodelle mutierter NR2A-Untereinheiten benutzt. Dazu wurden die jeweiligen Aminosäurereste des wt-Modells zunächst durch die gewünschten Reste in Standardkonformationen aus der Sybyl-Datenbank ersetzt. Anschließend erfolgte die Optimierung des neuen Molekülmodells in 3-4 Zyklen aus Dynamisierung und Energieminimierung unter Verwendung des Tripos-Kraftfelds mit Kollman-Ladungen. Die Dynamisierung erfolgte in 1 fs-Intervallen bei vorgegebener Temperatur von 300 K mit einem Kopplungsfaktor von 100 fs, was einem simulierten langsamen Aufheizen des Systems von 0 K auf 300 K entspricht. Die damit verbundene Erhöhung der kinetischen Energie gestattet dem System das Verlassen des lokalen Minimums, das die Ausgangsstruktur in der Regel auch nach der Mutation noch darstellt.

III. Ergebnisse

1. Auswahl geeigneter caged compounds für Versuche an NMDA-Rezeptoren

Da die zur Verfügung stehenden maskierten Ligandenvorstufen (II.2.4.3, Anhang C für detailliertere Beschreibung) zu Beginn der Arbeit nicht alle ausreichend auf ihre Eignung für Messungen an NMDA-Rezeptoren getestet waren, wurden zunächst entsprechende Versuche durchgeführt, um sicherzustellen, daß die maskierten Verbindungen nicht selbst Effekte auf den Rezeptor ausüben.

1.1 CNB-Verbindungen inhibieren den NMDA-Rezeptor

1.1.1 Inhibition durch CNB-Glutamat in Koapplikationsversuchen

Ein einfacher Test, um einen möglichen inhibitorischen Effekt maskierter Ligandenvorstufen festzustellen, besteht in der Koapplikation der Verbindung mit freiem Liganden und der gleichzeitigen Messung des ligandeninduzierten Stroms. Um eine klare Aussage zu liefern, sollte der Test mit Konzentrationen der maskierten Verbindung durchgeführt werden, die auch in Photolyseexperimenten eingesetzt werden. In den hier durchgeführten Inhibitionsversuchen wurden jeweils Konzentrationen im Bereich des EC_{50} der freien Agonisten sowohl der Glutamat- ($4\text{ }\mu\text{M}$) als auch der Glyzinbindungsstelle ($4,5\text{ }\mu\text{M}$) verwendet, um eine Sensitivitätssteigerung im Falle einer kompetitiven Hemmung über eine der Ligandenbindungsstellen zu erreichen. Um einer möglichen langsamen Kinetik der Inhibition zu begegnen, wurde zudem die maskierte Verbindung bereits acht Sekunden vor Zugabe der freien Agonisten appliziert. Abbildung 13a zeigt ein typisches Ergebnis eines Koapplikationsexperimentes mit CNB-Glutamat. Wie deutlich zu erkennen ist, führt die Anwesenheit des maskierten Glutamats zu einer Verminderung des durch Glutamat und Glyzin induzierten Stroms. Die in diesem Experiment verwendete Konzentration von 2 mM CNB-Glutamat liegt am oberen Rand des Konzentrations-

bereichs, der typischerweise in einem Photolyseexperiment eingesetzt würde. Ein inhibitorischer Effekt konnte jedoch auch mit niedrigeren Konzentrationen beobachtet werden. Aufgrund des relativ hohen Preises von CNB-Glutamat wurde auf die Erstellung einer genauen Inhibitionskurve und damit die Ermittlung eines exakten IC_{50} -Wertes verzichtet, die Messung vier verschiedener Konzentrationen an einer Zelle ergibt jedoch einen Schätzwert von 400 μM .

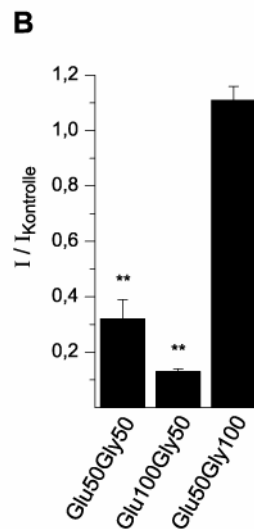
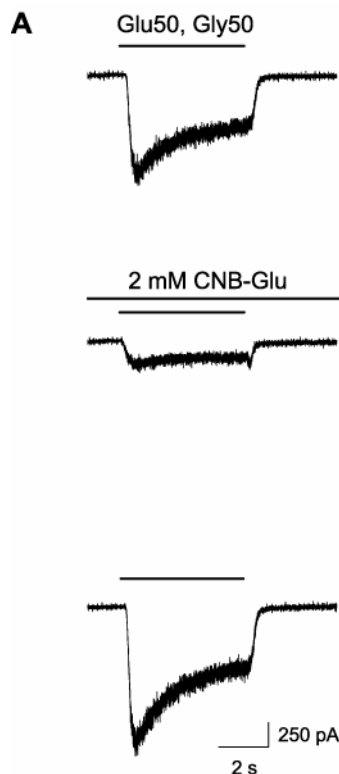


Abb. 13: Koapplikationsversuche mit CNB-Glutamat.

A: Aufeinanderfolgende Stromantworten einer Zelle auf Zugabe etwa halbsättigender Glutamat- (Glu50) und Glyzinkonzentrationen (Gly50) in Abwesenheit (oben), bei Koapplikation (Mitte) und nach Auswaschen von 2 mM CNB-Glutamat.

B: Überblick über Ergebnisse von Experimenten bei verschiedenen Glutamat- und Glyzinkonzentrationen. Zur Quantifizierung wurden die Ströme in Gegenwart von 2 mM CNB-Glutamat auf jeweils unmittelbar vor- und nachher gemessene Kontrollströme in Abwesenheit der Käfigverbindung normiert. Glu50Gly50: 4 μM Glutamat/4,5 μM Glyzin; Glu100Gly50: 100 μM Glutamat/4,5 μM Glyzin; Glu50Gly100: 4 μM Glutamat, 50 μM Glyzin.

1.1.2 Die Inhibierung durch CNB-Glutamat ist von der Glyzinkonzentration abhängig

Das eben beschriebene Koapplikationsexperiment wurde bei halbsättigenden Konzentrationen von Glutamat und Glyzin durchgeführt. Ein naheliegender Versuch, um einen ersten Einblick in den Mechanismus der Inhibierung durch CNB-Glutamat zu gewinnen, besteht in der Wiederholung des Experiments in Gegenwart sättigender Konzentrationen jeweils eines der Agonisten. Sollte der Inhibierung eine Konkurrenz der CNB-Verbindung mit Glutamat zugrunde liegen, müsste sie in Gegenwart einer sättigenden Glutamatkonzentration vermindert sein. Gleiches

müßte im Fall einer Konkurrenz mit Glyzin bei sättigender Glyzinkonzentration gelten. Abbildung 13b vergleicht die Ergebnisse entsprechender Versuche mit dem aus den Experimenten bei halbsättigenden Konzentrationen beider Liganden, wobei deutlich wird, daß nur eine Erhöhung der Glyzinkonzentration die Inhibierung durch CNB-Glutamat aufzuheben vermag. Ein kompetitiver, über die Glutamatbindungsstelle vermittelter Mechanismus scheidet damit als Ursache aus, Konkurrenz um die Glyzinbindungsstelle ist wahrscheinlich. Dieser Befund mag überraschen, da es zunächst einleuchtender scheint, daß ein Glutamatderivat eine Restaffinität zur Glutamatbindungsstelle zeigt, als daß es eine Affinität zur Glyzinbindungsstelle gewinnt, allerdings ist es möglich, daß diese Affinität weitgehend durch die CNB-Gruppe vermittelt wird. Ihre Glyzinabhängigkeit liefert außerdem eine plausible Erklärung, warum die Inhibierung durch CNB-Glutamat bisher unbemerkt blieb, obwohl die Verwendung dieser Verbindung zur Untersuchung auch von NMDA-Rezeptoren in der Literatur beschrieben ist ([28],[92]). Die entsprechenden Versuche wurden jedoch unter Bedingungen durchgeführt, unter denen die Glyzinkonzentration nicht kontrolliert und wahrscheinlich sättigend war.

1.1.3 Auch andere CNB-maskierte Liganden inhibieren den Rezeptor

Sollte der beobachtete inhibitorische Effekt auf CNB-Glutamat beschränkt sein, dann wäre die Verwendung anderer CNB-maskierter Liganden des NMDA-Rezeptors dennoch möglich. Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurde das unter 1.1.1 beschriebene Koapplikationsexperiment für die beiden anderen CNB-maskierten Liganden, die zur Verfügung standen, wiederholt. In allen Fällen zeigte sich dabei, wie in Abbildung 14a dargestellt, eine mehr oder weniger ausgeprägte Inhibierung. Dies macht es wahrscheinlich, daß es sich bei ihr um einen durch die CNB-Gruppe selbst vermittelten Effekt auf den NMDA-Rezeptor handelt.

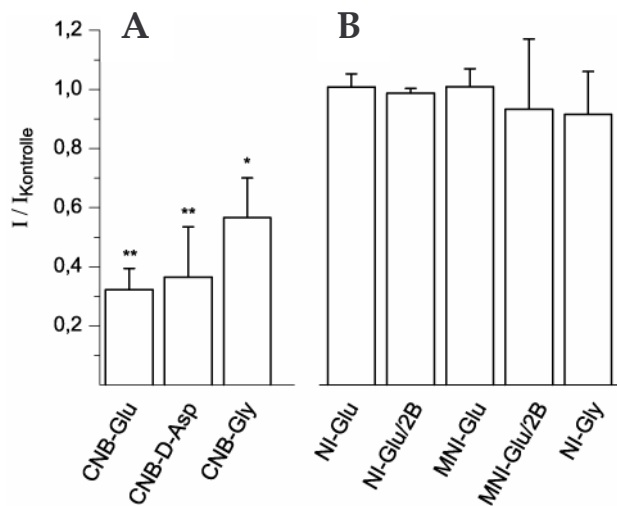


Abb. 14: Koapplikationsversuche mit verschiedenen CNB-, NI- und MNI-Verbindungen.

A: CNB-maskierte Liganden. Die relativen Ströme bezogen auf Kontrollströme in Abwesenheit der Testverbindung betragen:

CNB-Glutamat: $0,32 \pm 0,07$, $n=3$;

CNB-D-Aspartat: $0,36 \pm 0,17$, $n=3$;

CNB-Glyzin: $0,57 \pm 0,13$, $n=3$.

B: NI- und MNI-maskierte Liganden.

NI-Glutamat: $1,01 \pm 0,04$, $n=3$ an NR1/NR2A- bzw. $0,99 \pm 0,02$, $n=3$ an NR1/NR2B-Rezeptoren; MNI-Glutamat: $1,01 \pm 0,06$, $n=3$ an NR1/NR2A- bzw. $0,93 \pm 0,24$, $n=4$ an NR1/NR2B-Rezeptoren; NI-Glyzin: $0,92 \pm 0,15$, $n=3$;

1.2 NI- und MNI-maskierte Liganden sind inert am NMDA-Rezeptor

1.2.1 Koapplikationsversuche mit NI-/MNI-Verbindungen

Zur Bestimmung möglicher inhibitorischer Effekte NI- bzw. MNI-maskierter Liganden wurden diese analog ihren CNB-Gegenständen untersucht. Zwar wurden

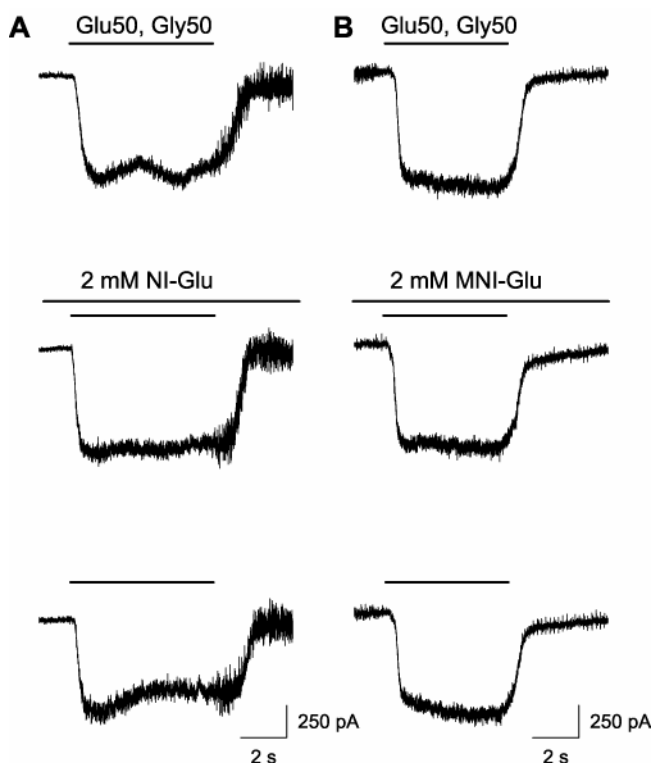


Abb. 15: Koapplikationsversuche mit (A) NI- und (B) MNI-Glutamat. Die Durchführung und Darstellung der Experimente entspricht der in Abbildung 13a.

entsprechende Versuche für NI- und MNI-Glutamat bereits bei der ursprünglichen Charakterisierung dieser Substanzen in der Arbeitsgruppe von Dr. J. Corrie durchgeführt [11], allerdings waren dabei sowohl die Konzentrationen an freiem Glutamat als auch an Glyzin im sättigenden Bereich. Daher wäre es möglich, daß ein inhibitorischer Effekt ähnlich dem CNB-maskierter Liganden übersehen wurde.

Wie Abbildung 15 exemplarisch zeigt konnte jedoch auch bei halbsättigenden Konzentrationen beider Agonisten kein Einfluß von NI- oder MNI-Glutamat (jeweils 2 mM) auf NMDA-Rezeptoren festgestellt werden. Dies gilt sowohl für NR1/NR2A- als auch für NR1/NR2B-Rezeptoren. Das selbe Ergebnis brachte die Untersuchung NI-maskierten Aspartats und Glyzins. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14b zusammengefaßt.

1.2.2 Vergleich durch Photolyse von CNB-, NI- und MNI-Glutamat hervorgerufener Ströme

Mit den bisher beschriebenen Koapplikationsexperimenten können Wechselwirkungen zwischen den maskierten Ligandenvorstufen und dem Rezeptor gut erfaßt werden. Allerdings ermöglichen sie keine Aussage über eventuelle Effekte der Nebenprodukte der Photolyse. Deshalb ist es nötig, das Verhalten der Verbindungen auch in Photolyseversuchen zu testen. Dabei können photolytisch hervorgerufene Ströme hinsichtlich ihrer Amplitude mit Kontrollströmen verglichen werden, die in Lösungswechselexperimenten durch Zugabe von freiem Agonisten in Abwesenheit der maskierten Verbindung erhalten wurden.

In Abbildung 16 sind repräsentative Photolyseexperimente mit den drei verschiedenen Glutamatvorstufen bei halbsättigenden bzw. sättigenden Glyzinkonzentrationen gezeigt. Die Ströme wurden dabei stets auf unmittelbar zuvor und im Anschluß durch Zugabe von freiem Glutamat in sättigender Konzentration (100 μ M) erhaltene Ströme normiert. Es ist zu erkennen, daß die Photolyse von NI- und MNI-Glutamat etwa gleich große Ströme hervorruft, deren Amplituden sowohl bei niedrigen als auch bei hohen Glyzinkonzentrationen den in den Kontroll-

experimenten beobachteten vergleichbar sind. Die Photolyse von CNB-Glutamat führt dagegen nur bei der sättigenden Glyzinkonzentration zu einer vergleichbaren Stromantwort.

Darüber hinaus zeigt eine Betrachtung der Kinetiken der Rezeptoraktivierung in Anwesenheit der hohen Glyzinkonzentration ähnliche Zeitkonstanten für den Stromanstieg nach Photolyse von NI- und MNI-Glutamat, jedoch eine langsamere für CNB-Glutamat (Abbildung 16c). Dies läßt darauf schließen, daß auch bei der hier verwendeten Glyzinkonzentration noch geringfügige Inhibierung auftritt. Dies bestätigt sich auch bei statistischer Auswertung der Kinetiken und Stromamplituden mehrerer Experimente. Während die Zeitkonstanten des Stromanstiegs für NI- und MNI-Glutamat untereinander keine signifikanten Unterschiede zeigen (NI-Glu: $2,57 \pm 0,14$ ms, $n=5$; MNI-Glu: $2,25 \pm 0,14$ ms, $n=4$), sind sie signifikant ($p < 0,01$) kleiner als für CNB-Glutamat ($3,86 \pm 0,17$ ms, $n=5$). Ebenso ergibt der Vergleich der normierten Amplituden keine signifikanten Abweichungen vom zu erwartenden Wert 1 für NI-

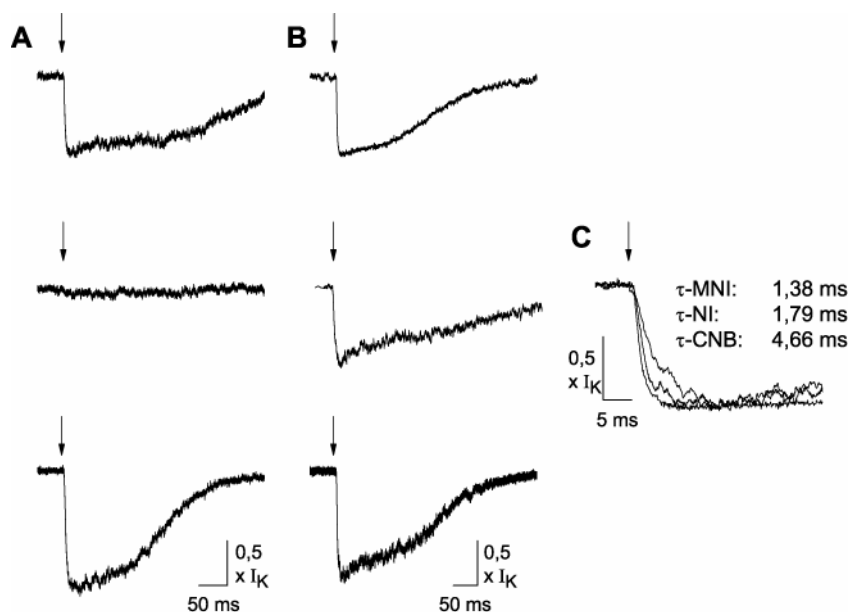


Abb. 16: Photolyseversuche mit CNB-, NI- und MNI-Glutamat.

Stromantworten auf photolytische Freisetzung jeweils sättigender Glutamatkonzentrationen aus 700 μ M NI-Glutamat (oben), 500 μ M CNB-Glutamat (Mitte) bzw. 700 μ M MNI-Glutamat (unten). Die gezeigten Messungen stammen von verschiedenen Zellen und wurden zu Vergleichszwecken auf Kontrollströme (I_K) aus Lösungswechselversuchen normiert. Pfeile kennzeichnen jeweils den Zeitpunkt des Laserpulses und der damit verbundenen Glutamatfreisetzung.

A: Messungen in Gegenwart von 4,5 μ M Glyzin. **B:** 100 μ M Glyzin. **C:** Vergleich der ersten 35 ms der Stromantworten in B. Angegeben sind die Zeitkonstanten, die sich aus exponentiellen Anpassungen an den ansteigenden Teil der Stromkurven ergeben.

und MNI-Glutamat ($1,16 \pm 0,13$, $n=4$ bzw. $1,19 \pm 0,14$, $n=2$), dagegen eine signifikante ($p < 0,01$) Inhibierung für CNB-Glutamat ($0,84 \pm 0,05$, $n=5$).

Damit bestätigen die Photolyseversuche qualitativ die Koapplikationsexperimente. Die stärkere Inhibierung durch CNB-Glutamat, die anders als bei der Koapplikation von CNB-Glutamat und freiem Glutamat auch noch bei $50 \mu\text{M}$ Glyzin nachweisbar ist, kann plausibel durch die in wässrigen Lösungen von CNB-Glutamat stets vorhandenen, durch spontane Hydrolyse verursachten Verunreinigungen mit freiem Glutamat erklärt werden. In den nominell bei halbsättigenden Glutamatkonzentrationen durchgeführten Koapplikationsexperimenten hat die durch diese Verunreinigungen bedingte Erhöhung der Glutamatkonzentration relativ große Auswirkung auf die Höhe der Stromantwort und kann so den inhibitorischen Effekt teilweise kompensieren. Insgesamt wird also das Ausmaß der Inhibierung durch CNB-Verbindungen bei der Koapplikation unterschätzt. Für die NI- und MNI-Verbindungen gilt dies nur in weit geringerem Umfang, weil sie aufgrund ihrer höheren Hydrolysestabilität praktisch keine freien Agonisten enthalten [74].

1.2.3 Charakterisierung von NI-Glyzin am NMDA-Rezeptor

Weder CNB- noch NI-Glyzin waren vor dieser Arbeit auf ihre Verwendbarkeit am

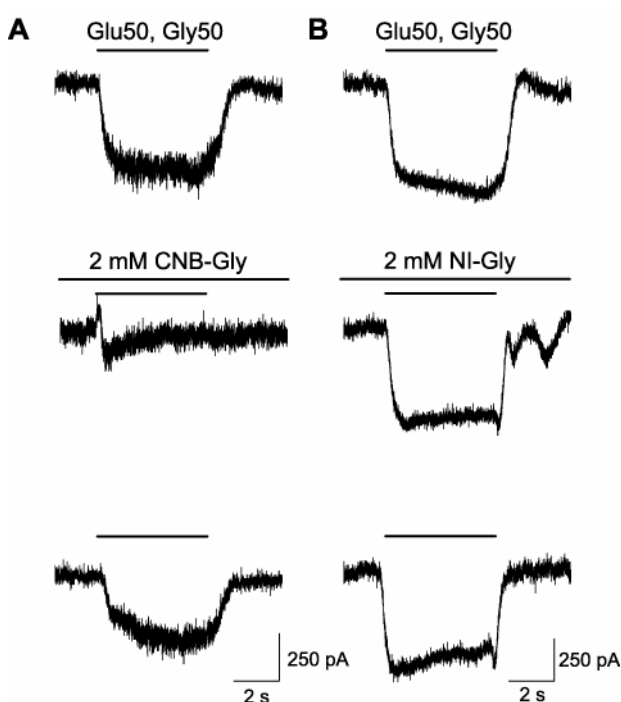


Abb. 17: Vergleich von (A) CNB- und (B) NI-Glyzin in Koapplikationsversuchen.

Durchführung und Darstellung der Experimente entsprechen Abbildung 13.

NMDA-Rezeptor getestet worden. Wie aus Abbildung 17 ersichtlich inhibiert CNB-Glyzin wie alle anderen getesteten CNB-Verbindungen den NMDA-Rezeptor. NI-Glyzin dagegen verhält sich bei Koapplikation inert.

Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurde ein weiterer Inhibierungstest durchgeführt. Hierbei wurden photolytisch gleiche Konzentrationen Glyzin durch entsprechende Anpassung der Lichtintensität aus zwei unterschiedlich konzentrierten Lösungen von NI-Glyzin freigesetzt. Ist NI-Glyzin tatsächlich inert, sollten die beobachteten Ströme in beiden Experimenten gleich groß sein. Inhibiert NI-Glyzin dagegen den Rezeptor, dann sollten bei der höheren Konzentration von NI-Glyzin kleinere Ströme auftreten (s. [68],[11] für frühere Anwendungen eines solchen Tests). Im vorliegenden Fall wurden jeweils 3 μM Glyzin, eine Konzentration knapp unterhalb des EC_{50} aus einer 100 μM und einer 250 μM (bei 40 % Lichtintensität) Lösung von NI-Glyzin freigesetzt. Um verschiedene Zellen miteinander vergleichen zu können, wurden die resultierenden Ströme auf Kontrollströme in Lösungswechselversuchen mit sättigenden Glutamat- und Glyzinkonzentrationen (je 100 μM) normiert.

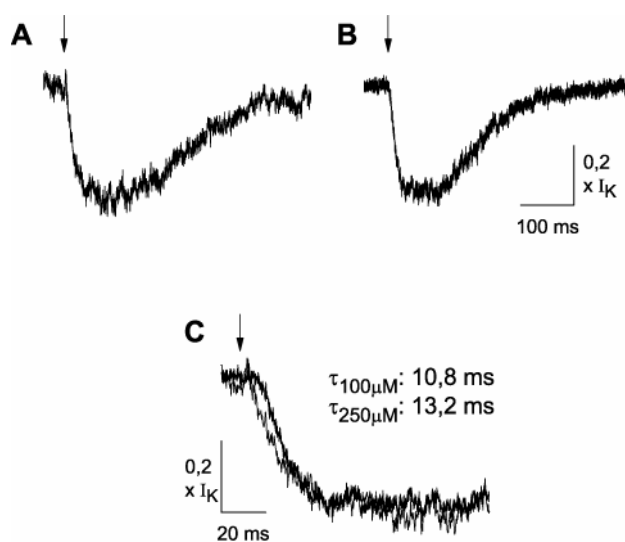


Abb. 18: NI-Glyzin in Photolyseversuchen. Stromantworten auf photolytische Freisetzung (Pfeile) von 3 μM Glyzin aus (A) 100 μM und (B) 250 μM NI-Glyzin in Gegenwart von jeweils 100 μM Glutamat. Die Messungen stammen von unterschiedlichen Zellen und wurden auf Kontrollströme (I_K) in Lösungswechselversuchen mit sättigenden Glutamat- und Glyzinkonzentrationen normiert. C: Vergleich der ersten 100 ms der Messungen in A und B mit Angabe der Zeitkonstanten aus exponentiellen Anpassungen an den ansteigenden Teil der Stromkurven.

Die sich so ergebenden relativen Stromamplituden von $0,44 (\pm 0,06, n=3)$ für 100 μM und $0,52 (\pm 0,07, n=3)$ für 250 μM NI-Glyzin sind nicht signifikant unterschiedlich (vgl. Abbildung 18a und b). Gleiches gilt auch für die Zeitkonstanten der ansteigenden Phasen der Stromantworten unter beiden Bedingungen (100 μM : $12,4 \pm 1,4$ ms, $n=3$; 250 μM : $15,7 \pm 2,8$ ms, $n=3$; Abbildung 18c). Damit konnte auch mit

diesem Ansatz keine Beeinflussung der Rezeptoraktivierung durch NI-Glyzin festgestellt werden. Die Verbindung scheint demnach für kinetische Untersuchungen am NMDA-Rezeptor geeignet zu sein.

2. Kinetische Charakterisierung von wt NMDA-Rezeptoren

Bevor mit der Charakterisierung mutanter Rezeptoren begonnen wurde, wurden zunächst die kinetischen Parameter von wt-Rezeptoren als Referenz bestimmt. Obwohl alle Messungen an mutanten Rezeptoren bei -60 mV erfolgten, wurde für wt-Rezeptoren auch eine mögliche Spannungsabhängigkeit der Parameterwerte geprüft, um die generelle Gültigkeit der Ergebnisse sicherzustellen. Zudem wurden zum Vergleich auch die NR1/NR2B-Untereinheitenkombination sowie die Kinetiken mit anderen Agonisten (Glyzin, L-Aspartat) untersucht. Als Nebenprojekt wurde schließlich auch die Auswirkung einer Expression von NR1/NR2A-Rezeptoren zusammen mit dem Adapterprotein PSD95 (s. I.5) untersucht.

2.1 NR1/NR2A-Rezeptoren

2.1.1 Glutamatabhängige Kinetiken

Abbildung 19a,b zeigt das Ergebnis eines typischen Photolyseversuches, in dem in aufeinanderfolgenden Messungen die Stromantworten der selben Zelle auf photolytische Freisetzung dreier verschiedener Glutamatkonzentrationen aufgezeichnet wurden. Drei Phasen der Stromsignale sind zu erkennen, die jeweils einzelnen Schritten der Rezeptoraktivierung zugeordnet werden können.

Auf (1) eine anfängliche Verzögerung (*lag*-Phase) folgt (2) die eigentliche Stromanstiegsphase, an die sich (3) eine Phase des Stromabfalls anschließt. Die *lag*-Phase spiegelt dabei die unmittelbar nach der Glutamatfreisetzung erfolgende Ligandenbindung wider und ihre Dauer ist daher von der Ligandenkonzentration abhängig. In der Stromanstiegsphase erfolgt hingegen überwiegend die Kanalöffnung. Sie enthält damit die für die Bestimmung der Offenwahrscheinlichkeit wichtigste Information. Der Stromabfall schließlich ist durch Desensitisierung

aktivierter Rezeptoren bedingt und setzt bei hohen Ligandenkonzentrationen früher ein, da hier auch die Aktivierung schneller erfolgt. Diese letzte Phase kann in Photolyseversuchen nur über einen kurzen Zeitraum beobachtet werden (II.2.5.3). Auf ihre Analyse und eine Aufnahme des Desensitisierungsschrittes in das kinetische Modell wurde daher verzichtet und für Anpassungen der kinetischen

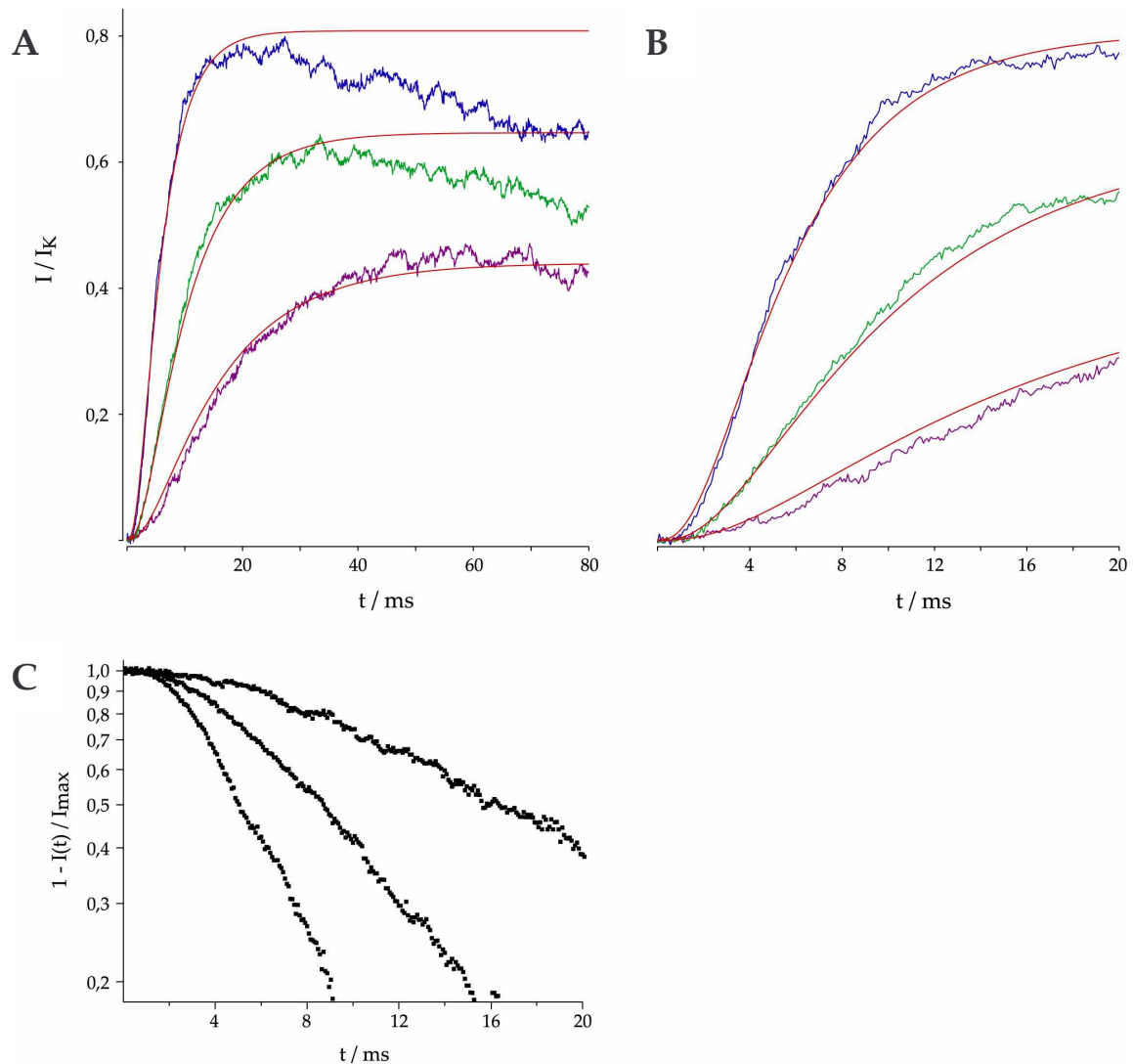


Abb. 19: Rezeptorkinetiken bei Aktivierung durch Glutamat. Gezeigt sind die Stromantworten einer Zelle auf die photolytische Freisetzung von 12,1 μM (blau), 5,9 μM (grün) und 3,3 μM Glutamat (violett). Alle Ströme wurden auf mit sättigenden Glutamatkonzentrationen beobachtete Ströme aus Lösungswechselversuchen normiert. **A:** Stromverläufe über 80 ms. **B:** Eine Ausschnittsvergrößerung der ersten 20 ms aus (A) läßt die von der Ligandenkonzentration abhängige *lag*-Phase erkennen. Die roten Linien stellen simulierte Stromverläufe mit den für diese Zelle ermittelten Werten der kinetischen Parameter dar ($k_{on} = 25 \mu M^{-1}s^{-1}$, $k_{off} = 108 s^{-1}$, $k_{op} = 693 s^{-1}$, $k_{cl} = 294 s^{-1}$). Für diese Anpassungen wurde nur der ansteigende Teil der Stromkurven verwendet. Das kinetische Modell (II.2.5.3) und damit auch die simulierten Stromverläufe berücksichtigen die Desensitisierung nicht. **C:** Darstellung der Ströme in der Form $1 - I(t)/I_{max}$. Es ist keine Linearität zu erkennen.

Parameter stets nur der ansteigende Teil von Stromkurven verwendet (II.2.5.3).

Unter der Voraussetzung, daß während der Stromanstiegsphase die Kanalöffnung den allein geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Aktivierungsprozesses darstellt, daß also unter den Meßbedingungen die Ligandenbindung deutlich schneller als die Kanalöffnung ist, läßt sich die Stromanstiegsphase durch die exponentielle Beziehung:

$$I(t) = I_{\max} * (1 - e^{(-k_{\text{app}} * t)}) \quad (1)$$

beschreiben, wobei für die apparente Ratenkonstante des Stromanstiegs

$$k_{\text{app}} = k_{\text{op}} * \left(\frac{L}{L + K_D} \right)^2 + k_{\text{cl}} \quad (2)$$

gilt [39]. D.h. aus der Abhängigkeit der Stromanstiegsphase von der Ligandenkonzentration lassen sich k_{op} und k_{cl} , und damit auch p_o bestimmen. Die Gültigkeit von (1) kann graphisch durch Auftragung von $\ln (1 - I(t) / I_{\max})$ gegen die Zeit t geprüft werden, was eine Gerade der Steigung $-k_{\text{app}}$ ergeben sollte. Abbildung 19c zeigt diese Art der Darstellung für die Ströme in 19a und b. In keinem der drei Fälle ist eine klare zeitliche Abgrenzung der *lag*-Phase von einem linearen Teil, der die ansteigende Phase des Signals repräsentiert, möglich, was bedeutet, daß zu keinem Zeitpunkt der Aktivierung die Kanalöffnung allein geschwindigkeitsbestimmend ist. Dies unterscheidet die Kinetiken des NMDA-Rezeptors von der einer Reihe anderer ligandengesteuerter Ionenkanäle, für die eine solche zeitliche Abgrenzung und eine analytische Bestimmung der Werte von Öffnungs- und Schließraten basierend auf Gleichung (2) erfolgreich durchgeführt werden konnte ([39],[63],[44],[58],[57],[59]). Der Grund für diese Sonderstellung der NMDA-Rezeptoren ist vorwiegend in ihrer hohen Affinität ($K_D = 1 - 10 \mu\text{M}$) für Glutamat zu sehen. Da die Geschwindigkeit jedes Ligandenbindungsschrittes der Ligandenkonzentration proportional ist, die der intrinsischen Kanalöffnung dagegen konzentrationsunabhängig, kann prinzipiell für jeden ligandengesteuerten Ionenkanal die Ligandenkonzentration so gewählt werden, daß die Bindung deutlich schneller als die Kanalöffnung erfolgt und die

Gleichungen (1) und (2) gültig sind. Allerdings erfordert Gleichung (2), daß ausreichend Messungen bei Konzentrationen durchgeführt werden, bei denen nicht $L \gg K_D$ ist, weil sonst $L / (L + K_D)$ stets ungefähr 1 und damit Gleichung (2) $k_{op} + k_{cl}$ ergäbe. Anders ausgedrückt läßt sich aus Messungen bei Ligandenkonzentrationen weit über der wahren Affinität nur die Summe aus Öffnungs- und Schließrate bestimmen, die allein aber nichts über die Offenwahrscheinlichkeit aussagt. Für die hochaffinen NMDA-Rezeptoren müssen daher Messungen bei relativ niedrigen Konzentrationen (kleiner 5 μM) durchgeführt werden, bei denen die Ungültigkeit von Gleichung 1 deutlich wahrscheinlicher ist als bei höheren Konzentrationen wie sie für eher niederaffine Rezeptoren verwendet werden. Beispielsweise beträgt in [39] die niedrigste zur Untersuchung des inhibitorischen Glyzinrezeptors ($K_D = 95 \mu\text{M}$) eingesetzte Ligandenkonzentration 20 μM . Für NR1/NR2A-Rezeptoren ergibt sich mit dem hier ermittelten K_D (s. u.) bei dieser Konzentration aber ($L / L + K_D$) bereits zu 0,85. Die Bestimmung der Öffnungs- und Schließrate von NMDA-Rezeptoren ist daher in dieser Weise nicht möglich. Einen Ausweg stellt das hier verwendete und unter II.2.5.3 beschriebene numerische Verfahren dar, das keine Abgrenzbarkeit von *lag*-Phase und Stromanstiegsphase erfordert.

Unter Verwendung dieses Verfahrens wurden für NR1/NR2Awt-Rezeptoren ($n=8$) folgende Werte für die Ratenkonstanten der Glutamatbindung und -dissoziation sowie der Öffnung und des Schließens des Kanals erhalten: $k_{on} = 50 \pm 6 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{off} = 170 \pm 40 \text{ s}^{-1}$, $k_{op} = 410 \pm 90 \text{ s}^{-1}$ und $k_{cl} = 240 \pm 50 \text{ s}^{-1}$. Die entsprechenden Werte für Affinität und Offenwahrscheinlichkeit sind $K_D = 3,4 \pm 0,6 \mu\text{M}$ und $p_o = 0,60 \pm 0,08$. Der EC_{50} -Wert für Glutamat liegt den Daten nach bei $3,1 \pm 0,5 \mu\text{M}$. Dies entspricht zwangsläufig dem aus Lösungswechselversuchen erhaltenen Wert, weil dieser zur Kalibrierung der Glutamatfreisetzung in den Photolyseexperimenten benutzt wurde (s. II.2.5.1).

Wie Abbildung 19 zeigt ermöglicht das kinetische Modell eine sehr gute Beschreibung der gemessenen Stromantworten. Auch bleibt die Variabilität der Ergebnisse von Zelle zu Zelle in einem für statistische Zwecke ausreichenden Rahmen. Unter

den ermittelten Werten fällt besonders der der Offenwahrscheinlichkeit auf, der deutlich niedriger liegt als der vieler anderer ligandengesteuerter Ionenkanäle. Ein derartiges Ergebnis war aufgrund von Literaturdaten erwartet worden. Für eine detaillierte Einordnung der Ergebnisse sei aber auf den entsprechenden Abschnitt der Diskussion (IV.2) verwiesen.

Spannungsabhängigkeit

Die bisherigen Daten stammen, wie auch alle weiteren in dieser Arbeit, aus Messungen bei -60 mV. Es bietet sich jedoch an, die Methode zumindest für wt-Rezeptoren auch zur Untersuchung der Spannungsabhängigkeit der Rezeptor-kinetiken einzusetzen. Tabelle 3 vergleicht Messungen bei -90 mV, -60 mV, -30 mV und +30 mV hinsichtlich der jeweils ermittelten Werte der kinetischen Parameter.

	-90 mV	-60 mV	-30 mV	+30 mV
$k_{\text{on}} / \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	50 ± 20	50 ± 6	30 ± 10	55 ± 20
$k_{\text{off}} / \text{s}^{-1}$	160 ± 60	170 ± 40	90 ± 50	160 ± 50
$K_D / \mu\text{M}$	$3,9 \pm 0,5$	$3,4 \pm 0,6$	$3,0 \pm 0,8$	$3,0 \pm 0,7$
$k_{\text{op}} / \text{s}^{-1}$	700 ± 210	410 ± 90	700 ± 250	890 ± 290
$k_{\text{cl}} / \text{s}^{-1}$	250 ± 200	240 ± 50	460 ± 230	250 ± 180
p_o	$0,74 \pm 0,11$	$0,60 \pm 0,08$	$0,61 \pm 0,13$	$0,77 \pm 0,13$
$\text{EC}_{50} / \mu\text{M}$	$2,9 \pm 1,4$	$3,1 \pm 0,5$	$3,0 \pm 1,8$	$2,1 \pm 1,2$
n	2	8	2	2

Tab. 3: Spannungsabhängigkeit der kinetischen Parameter der Rezeptoraktivierung.

Abbildung 20 stellt die selben Ergebnisse graphisch dar. Für -60 mV wurden die bereits oben gezeigten Daten verwendet ($n = 8$), den übrigen Werten liegen jeweils Messungen an zwei Zellen zugrunde.

Für keinen der kinetischen Parameter ist eine Spannungsabhängigkeit im untersuchten Bereich erkennbar. Im Fall der Offenwahrscheinlichkeit deckt sich dieses Ergebnis mit den Erwartungen insofern, als in Abwesenheit extrazellulärer

Mg²⁺-Ionen die Stromspannungskurve für NMDA-Rezeptoren annähernd linear verläuft (Abbildung 20b und [66]), was nur schwer mit einer Spannungsabhängigkeit von p_o vereinbar wäre.

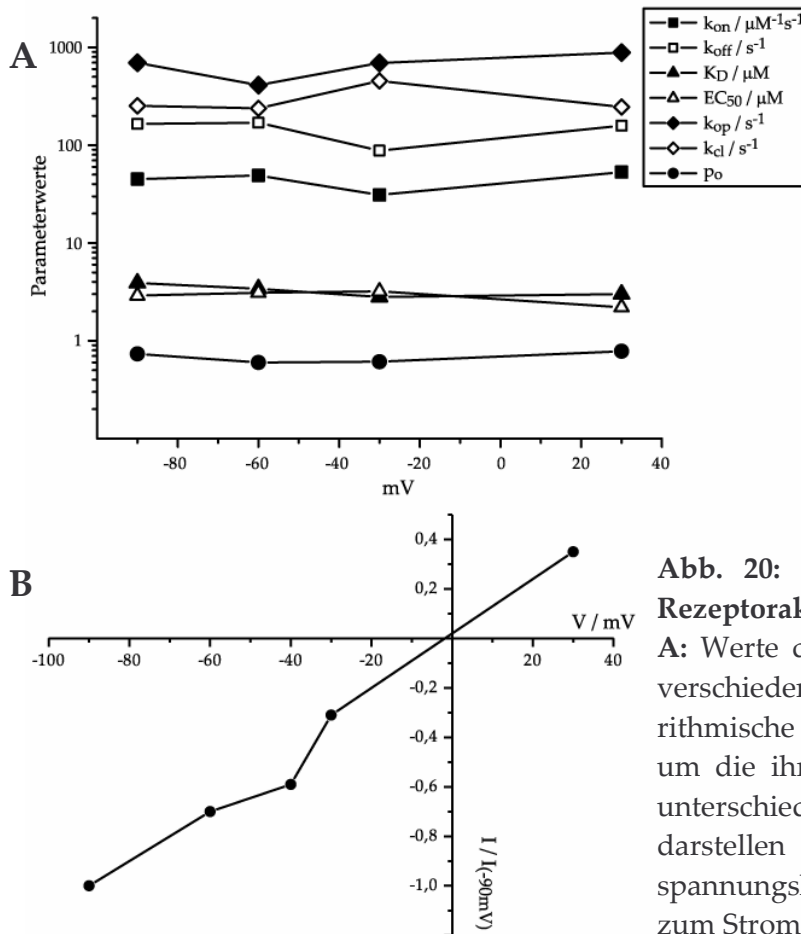


Abb. 20: Spannungsabhängigkeit der Rezeptoraktivierung.

A: Werte der kinetischen Parameter bei verschiedenen Spannungen. Die logarithmische Auftragung wurde gewählt, um die ihren Absolutwerten nach sehr unterschiedlichen Parameter gemeinsam darstellen zu können. **B:** Stromspannungskurve. Die Ströme sind relativ zum Strom bei -90 mV dargestellt.

2.1.2 Glyzinabhängige Kinetiken

Die Bestimmung der glyzinabhängigen Kinetiken erfolgte analog der der glutamatabhängigen, wobei anstelle von Glutamat Glyzin aus seiner maskierten Vorstufe freigesetzt wurde und Glutamat in sättigender Konzentration vorappliziert wurde. Da NI-Glyzin im Gegensatz zu NI- und MNI-Glutamat aber nicht kommerziell erhältlich ist, konnte nur auf relativ kleine Mengen der Verbindung zurückgegriffen werden, die am NIMR in London synthetisiert worden waren. Die Zahl der Messungen war daher beschränkt und der Auswertung liegen die Daten nur zweier Zellen zugrunde.

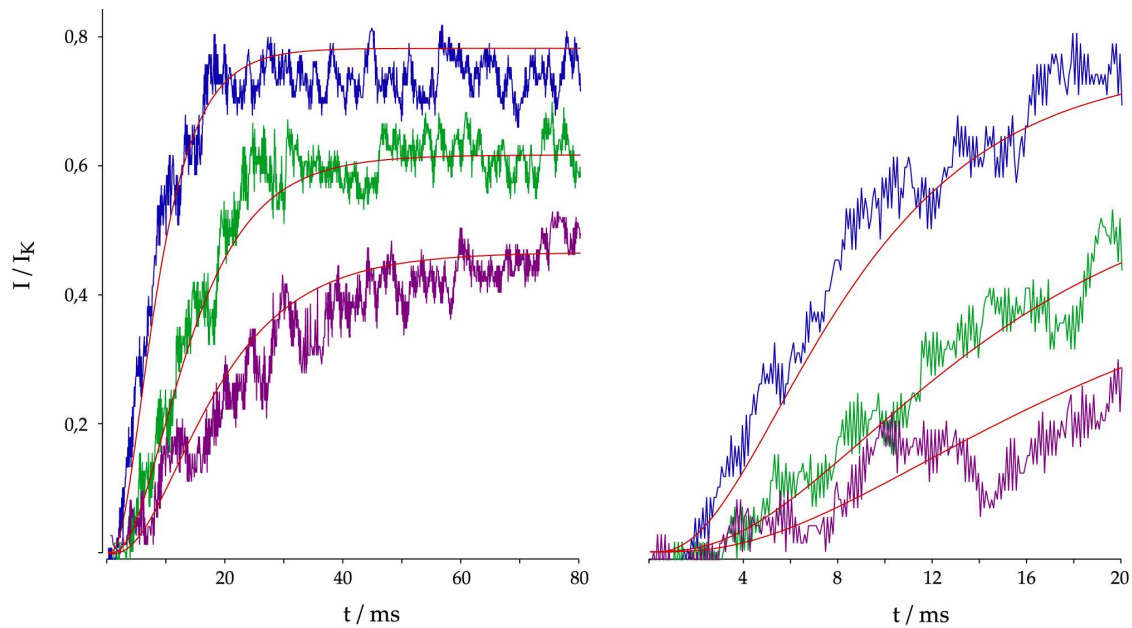


Abb. 21: Rezeptorkinetiken bei Aktivierung durch Glyzin. Gezeigt sind die Stromantworten einer Zelle auf die photolytische Freisetzung von 6,0 μM (blau), 2,4 μM (grün) und 1,3 μM Glyzin (violett). Alle Ströme wurden auf mit sättigenden Glyzinkonzentrationen beobachtete Ströme aus Lösungswechselversuchen normiert. **A:** Stromverläufe über 80 ms. **B:** Ausschnittsvergrößerung der ersten 20 ms aus (A). Die roten Linien stellen simulierte Stromverläufe mit den für diese Zelle ermittelten Werten der kinetischen Parameter dar ($k_{\text{on}} = 53 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{\text{off}} = 76 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{op}} = 317 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{cl}} = 130 \text{ s}^{-1}$).

Die erhaltenen Werte der Ratenkonstanten sind $k_{\text{on}} = 60 \pm 3 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{\text{off}} = 90 \pm 10 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{op}} = 350 \pm 30 \text{ s}^{-1}$ und $k_{\text{cl}} = 130 \pm 5 \text{ s}^{-1}$. Weiterhin ergeben sich $K_{\text{D}} = 1,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$, $p_{\text{O}} = 0,74 \pm 0,03$ sowie $\text{EC}_{50} = 1,3 \pm 0,1 \mu\text{M}$. Da das aktivierende Agonistenpaar Glutamat/Glyzin das selbe wie bei der Bestimmung der glutamatabhängigen Kinetiken war, sollten die Ergebnisse für k_{op} , k_{cl} und p_{O} den dortigen entsprechen. Die Abweichungen dürften im wesentlichen auf die geringe Zahl der Messungen mit NI-Glyzin zurückzuführen sein. Die Bindungsraten für Glutamat und Glyzin sind einander sehr ähnlich, die etwas höhere Glyzinaffinität ist auf dessen niedrigere Dissoziationsrate zurückzuführen.

2.2 NR1/NR2B-Rezeptoren

NMDA-Rezeptoren der Untereinheitenkombination NR1/NR2B zeigen höhere apparente Affinitäten sowohl für Glutamat als auch für Glyzin als NR1/NR2A-

Rezeptoren. Daneben ist über eine niedrigere Offenwahrscheinlichkeit verglichen mit NR1/NR2A-Rezeptoren spekuliert worden [17], ohne daß dies jedoch einwandfrei belegt werden konnte. Der Vergleich der beiden Rezeptorsubtypen war für diese Arbeit vor allem deshalb von Interesse, weil wie einleitend dargestellt die ursprünglichen Mutagenesestudien, die zur Identifizierung der hier näher analysierten Kandidaten-Mutationen führten, an NR1/NR2B-Rezeptoren durchgeführt worden sind, während hier die entsprechenden Mutationen im NR1/NR2A-Subtyp untersucht werden.

Die aus vier Zellen erhaltenen Werte der Ratenkonstanten für NR1/NR2B-Rezeptoren sind (* = signifikanter Unterschied zu NR1/NR2A) $k_{on} = 30 \pm 7 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{off} = 70 \pm 9 \text{s}^{-1}$ *, $k_{op} = 340 \pm 140 \text{s}^{-1}$ und $k_{cl} = 150 \pm 70 \text{s}^{-1}$. K_D beträgt $2,3 \pm 0,4 \mu\text{M}$, p_o $0,69 \pm 0,08$ und der EC_{50} $1,9 \pm 0,2 \mu\text{M}$ *. Letzteres entspricht exakt dem EC_{50} -Wert ($1,9 \pm 0,1 \mu\text{M}$; $n = 3$) wie er aus Lösungswechselexperimenten erhalten wurde. Die kinetischen Parameter spiegeln also die etwas höhere Affinität für Glutamat wider, dagegen läßt sich kein signifikanter Unterschied zu NR1/NR2A-Rezeptoren bezüglich k_{op} , k_{cl} oder p_o nachweisen. Insgesamt ähneln sich die Kinetiken von NR2A- und NR2B-Rezeptoren stark. Dies und der hohe Grad an Sequenzübereinstimmung im Bereich ihrer Bindungsdomänen lassen den Schluß zu, daß sich Mutationen an homologen Positionen auf beide Subtypen ähnlich auswirken dürften.

2.3 Aktivierungskinetiken mit L-Aspartat

Neben MNI- und NI-Glutamat sowie NI-Glyzin erwies sich auch NI-Aspartat für Untersuchungen an NMDA-Rezeptoren als geeignet (III.1.2). Die Bestimmung der Rezeptorkinetik bei Aktivierung durch einen anderen Agonisten als Glutamat ist für das Ziel der Arbeit nicht unbedingt notwendig, kann aber als Kontrollexperiment angesehen werden, da die Kinetiken die bekannten makroskopischen Unterschiede zwischen den Agonisten erklären sollten. So wirkt L-Aspartat an NR1/NR2A-Rezeptoren als voller Agonist (relative Effizienz: $1,01 \pm 0,01$, $n=3$), d.h. die maximalen durch Aspartat induzierbaren Ströme entsprechen denen mit Glutamat. Dabei ist die

Affinität der Rezeptoren zu Aspartat aber deutlich niedriger als zu Glutamat, der hier bestimmte EC_{50} beträgt $49 \pm 2 \mu\text{M}$ ($n = 3$). Die kinetischen Parameter sollten diese Änderung widerspiegeln, während sich p_o wie für Glutamat ergeben sollte. Die Analyse der Rezeptoraktivierung durch L-Aspartat ergibt $k_{on} = 8 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{off} = 230 \text{ s}^{-1}$, $k_{op} = 240 \text{ s}^{-1}$, $k_{cl} = 150 \text{ s}^{-1}$ und damit $K_D = 31 \mu\text{M}$, $p_o = 0,61$ und $EC_{50} = 35 \mu\text{M}$. Wie schon für NI-Glyzin standen auch für NI-Aspartat nur geringe Mengen der Verbindung zur Verfügung. Es handelt sich deshalb hier um Ergebnisse mit einer Zelle. Dennoch läßt sich erkennen, daß die Daten prinzipiell mit den Erwartungen übereinstimmen. Die Offenwahrscheinlichkeit entspricht der bei Aktivierung mit Glutamat, d.h. Aspartat ist auch hiernach voller Agonist. Die EC_{50} -Werte aus Lösungswechsel- und Photolyseversuchen liegen ebenfalls nahe zusammen, wobei die Verschiebung im Vergleich zu Glutamat überwiegend durch eine geringere Bindungsrate zustande kommt.

2.4 Koexpression mit PSD95

Wie einleitend dargestellt ist PSD95 eine Art Adapterprotein, das NMDA-Rezeptoren an der Synapse verankert und mit anderen Komponenten der postsynaptischen Dichte verbindet. Auch gibt es Hinweise darauf, daß das Protein direkt die

	2Awt	wt mit PSD	2A Δ PSD	2A Δ PSD mit PSD	2A Δ PSD mit und ohne PSD
$k_{on} / \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	50 ± 6	40 ± 5	40 ± 7	50 ± 3	40 ± 4
k_{off} / s^{-1}	170 ± 40	110 ± 40	70 ± 20	70 ± 4	70 ± 10 *
$K_D / \mu\text{M}$	$3,4 \pm 0,6$	$2,3 \pm 0,8$	$2,1 \pm 1,1$	$1,5 \pm 0,1$ *	$1,8 \pm 0,5$ *
k_{op} / s^{-1}	410 ± 90	460 ± 170	210 ± 60	170 ± 40	190 ± 30 *
k_{cl} / s^{-1}	240 ± 50	290 ± 160	110 ± 20	80 ± 4 *	100 ± 10 *
p_o	$0,60 \pm 0,08$	$0,60 \pm 0,16$	$0,64 \pm 0,10$	$0,66 \pm 0,06$	$0,65 \pm 0,05$
$EC_{50} / \mu\text{M}$	$3,1 \pm 0,5$	$1,7 \pm 0,3$ *	$1,7 \pm 0,5$ *	$1,5 \pm 0,2$ *	$1,6 \pm 0,2$ *
n	8	5	3	3	6
* = $p < 0.05$					

Tab. 4: Auswirkung der Koexpression von PSD-95 auf die kinetischen Eigenschaften von wt- und C-terminal verkürzten (Δ PSD) NR1/NR2A-Rezeptoren.

Offenwahrscheinlichkeit von NMDA-Rezeptoren beeinflussen könnte (s. I.5).

In Zusammenarbeit mit Prof. Stephenson, aus deren Arbeitsgruppe die entsprechenden Ergebnisse ([81],[80]) stammen, sollte diese Hypothese mit dem hierfür gut geeigneten Ansatz dieser Arbeit überprüft werden. Dazu wurden NR1/NR2A-Rezeptoren in HEK-Zellen mit PSD95 koexprimiert und auf ihre kinetischen Daten hin untersucht. Als Kontrolle standen mutierte Rezeptoren zur Verfügung, in denen das C-terminale PSD-Bindemotiv deletiert ist und deren Eigenschaften daher unabhängig von der Koexpression von PSD95 sein sollten. In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der Koexpressions- und Kontrollversuche einander gegenübergestellt und mit den wt-Ergebnissen verglichen.

Entgegen der Annahme zeigt sich keinerlei Effekt der Koexpression auf die Offenwahrscheinlichkeit. Die Daten für wt-Rezeptoren in Gegenwart und Abwesenheit von PSD95 stimmen vielmehr fast vollständig überein. Lediglich für die Dissoziationsrate und damit für Affinität und EC_{50} für Glutamat ist ein geringfügiger Unterschied zu erkennen, der allerdings nur im Fall des EC_{50} signifikant ist. Allerdings scheint die Koexpression zu höherer Affinität zu führen, was entgegengesetzt zu den in der Literatur beschriebenen Änderungen [99] ist. Überraschenderweise hat zudem die Deletion des PSD-Bindemotivs einen sehr ähnlichen Effekt auf die Glutamataffinität. Da die Ergebnisse für die Rezeptoren mit deletiertem Bindemotiv allein und zusammen mit PSD95 erwartungsgemäß nahezu identisch sind, wurden sie zur Verbesserung der statistischen Signifikanz auch zusammen analysiert. Es zeigt sich dann, deutlicher als für die Einzelversuche, daß die Deletion der C-terminalen 4 Aminosäuren sowohl eine Abnahme der Dissoziations- als auch der Öffnungs- und Schließrate zur Folge hat. Weil die letzten beiden aber etwa gleich stark reduziert sind, wirkt sich dies nicht auf die Offenwahrscheinlichkeit aus.

Ein Effekt von PSD95 auf die Offenwahrscheinlichkeit konnte in diesen Versuchen nicht nachgewiesen werden. Die sehr ähnlichen Ergebnisse für wt-Rezeptoren in An- und Abwesenheit des Adapterproteins demonstrieren aber immerhin die Repro-

duzierbarkeit der Ergebnisse. Ein Erklärungsversuch für die unerwarteten Affinitätsänderungen sowohl bei Koexpression von PSD95 als auch in den Rezeptoren mit deletiertem PSD95-Bindemotiv findet sich im Diskussionsteil (IV.2).

3. Kinetische Charakterisierung mutanter NMDA-Rezeptoren

Die Messungen an mutanten NMDA-Rezeptoren stellen den eigentlichen Schwerpunkt der Arbeit dar. Insgesamt wurden 6 Mutationen an vier verschiedenen Positionen untersucht. Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse im Überblick. Die folgenden Abschnitte beschäftigen sich ausführlicher mit den einzelnen Mutationen.

	wt	H460A	E387A	K459E	N665D	K459N	N665K
kon / $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	50 ± 6	$8 \pm 2^{**}$	$20 \pm 3^*$	$20 \pm 6^{**}$	30 ± 6	$30 \pm 1^*$	$30 \pm 5^*$
koff / s^{-1}	170 ± 40	$1100 \pm 400^{**}$	$660 \pm 220^*$	$290 \pm 30^*$	90 ± 30	130 ± 30	$330 \pm 40^{**}$
KD / μM	$3,4 \pm 0,6$	$150 \pm 40^{**}$	$40 \pm 20^{**}$	$25 \pm 7^{**}$	$2,7 \pm 0,5$	$4,7 \pm 0,8$	$14 \pm 2^{**}$
kop / s^{-1}	410 ± 90	400 ± 240	370 ± 200	420 ± 140	200 ± 50	350 ± 80	$180 \pm 70^*$
kcl / s^{-1}	240 ± 50	$560 \pm 150^*$	290 ± 40	$520 \pm 160^*$	$30 \pm 8^{**}$	120 ± 30	220 ± 8
po	$0,60 \pm 0,08$	$0,38 \pm 0,16$	$0,49 \pm 0,12$	$0,41 \pm 0,13$	$0,86 \pm 0,05^*$	$0,70 \pm 0,10$	$0,40 \pm 0,08$
EC ₅₀ / μM	$3,1 \pm 0,5$	$220 \pm 20^{**}$	$45 \pm 12^{**}$	$35 \pm 11^{**}$	$1,3 \pm 0,3^{**}$	$3,9 \pm 0,7$	25 ± 4
n	8	3	3	5	4	4	5

Tab. 5: Übersicht über die Ergebnisse mit mutanten Rezeptoren und Vergleich ihrer kinetischen Eigenschaften mit denen des wt-Rezeptors.

3.1 NR1/NR2A(H460A)

Die Mutation NR2A(H460A) hat wie auch in NR2B-Rezeptoren eine drastische Erhöhung des EC₅₀-Werts zur Folge. Dem Strukturmodell nach sollte diese wenigstens zu einem großen Teil auf eine verringerte Affinität zu Glutamat zurückzuführen sein. Histidin 460 scheint über seinen Seitenkettenring eine nicht-polare Wechselwirkung mit dem Kohlenwasserstoffrückgrat des Liganden einzugehen.

Das durch die Mutation eingeführte Alanin sollte aufgrund der geringen Größe seiner Seitenkette für eine ähnliche Wechselwirkung zu weit entfernt liegen. Die kinetischen Daten bestätigen den Affinitätsverlust und erklären ihn mit dem kombinierten Effekt einer erhöhten Dissoziations- und einer verminderten Bindungsrate des Liganden. Ebenfalls signifikant ist daneben die Erhöhung der Kanalschließrate. Die damit verbundene Verringerung der Offenwahrscheinlichkeit

trägt zwar vergleichsweise wenig zur EC₅₀-Verschiebung bei, ist aber signifikant und wird im Diskussionsteil genauer betrachtet.

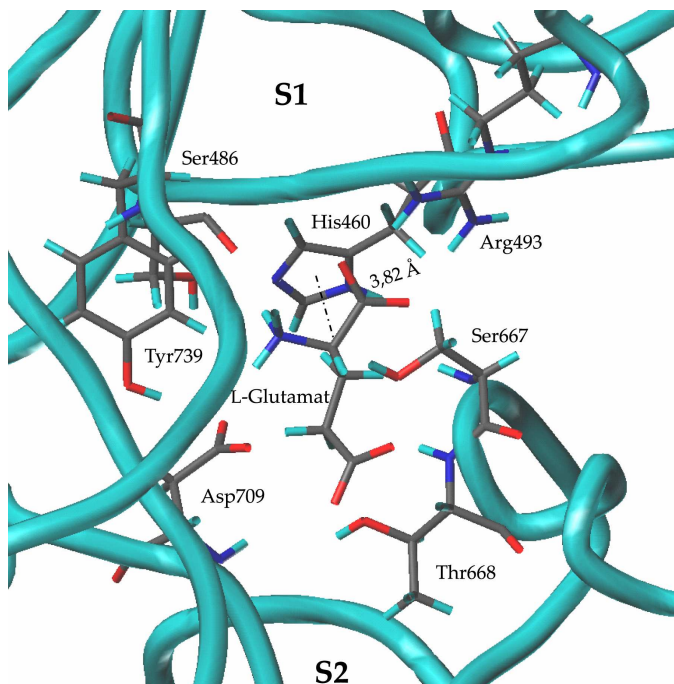


Abb. 22: Beteiligung von Histidin 460 an der Ligandenbindung. Das Strukturmodell der Ligandenbindungsdomäne der NR2A-Untereinheit ist im Bereich der Bindungsstelle dem der NR2B-Untereinheit (Abbildung 7, I.8) sehr ähnlich. Wie auch dort scheint Histidin 460 eine nicht-polare Wechselwirkung mit dem Ligandenrückgrat auszubilden. Zur Verdeutlichung der Verhältnisse in der Bindungstasche sind als weitere direkt an der Bindung beteiligte Reste Serin 486, Arginin 493, Serin 667, Threonin 668, Aspartat 709 und Tyrosin 739 gezeigt, die alle in der NR2B-Untereinheit konserviert sind. Generell sind homologe Reste an Positionen > 600 in NR2A um drei Positionen gegenüber NR2B verschoben.

3.2 NR1/NR2A(E387A)

Die Mutation von Glutamat 387 zu Alanin resultiert wie in NR2B in einer starken Verschiebung des EC₅₀ ($436 \pm 232 \mu\text{M}$, $p < 0,01$). Anders als für H460A wird die Ursache hierfür aus dem Strukturmodell jedoch nicht ohne weiteres ersichtlich. E387 liegt in der S1-Domäne an der Grenzfläche zu S2 und geht dem Modell nach keine Wechselwirkungen mit dem Liganden ein. Andererseits ist auch keine eindeutige Interaktion mit Resten der S2-Domäne zu erkennen. Allenfalls mit der α -Aminogruppe von Valin 691 (688 in NR2B) wäre eine Wasserstoffbrücke denkbar, doch ist der Abstand im Modell relativ groß (Abbildung 23).

Die kinetische Analyse der Mutante weist sie als reine Affinitätsmutante aus, in der vor allem die Dissoziationsrate für Glutamat deutlich erhöht ist. Dagegen sind keine signifikanten Änderungen in k_{op} , k_{cl} oder p_0 nachweisbar. Diese Daten unterstützen ein kürzlich publiziertes verfeinertes Modell der NR2B-Bindungstasche [55], in dem

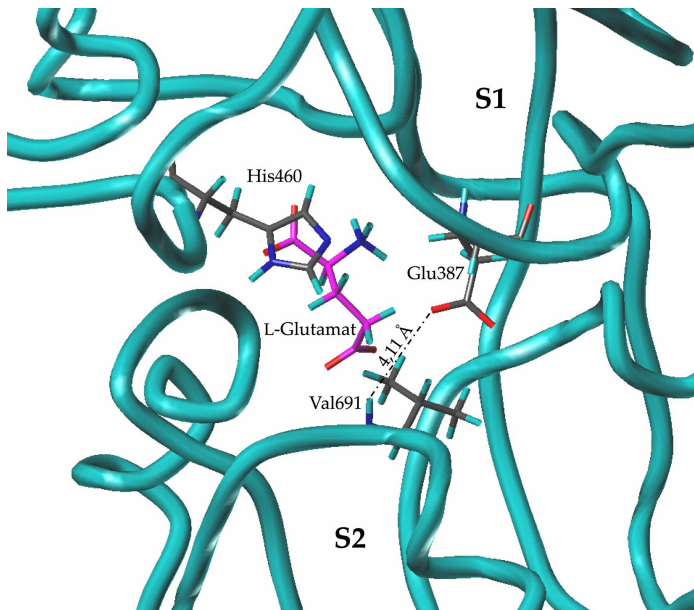


Abb. 23: Glutamat 387 im Strukturmodell. Wie schon im NR2B-Modell lässt sich für Glutamat 387 kein eindeutiger Partner für eine Wechselwirkung identifizieren. Denkbar ist allenfalls eine Wasserstoffbrücke zur NH-Gruppe von Valin 691, jedoch ist der Modell-Abstand von 4,11 Å dafür sehr groß. Zur Darstellung von Glu 387 ist das Modell gegenüber der vorherigen Ansicht in Abbildung 22 um etwa 180 ° gedreht. Zur Orientierung ist deshalb nochmals Histidin 460 gezeigt.

zusätzlich zu Aspartat 706 (709 in NR2A, Abbildung 22) auch das benachbarte Tyrosin 705, über eine Kation- π -Wechselwirkung mit der Ammoniumgruppe, an der Ligandenbindung beteiligt ist (Abbildung 24).

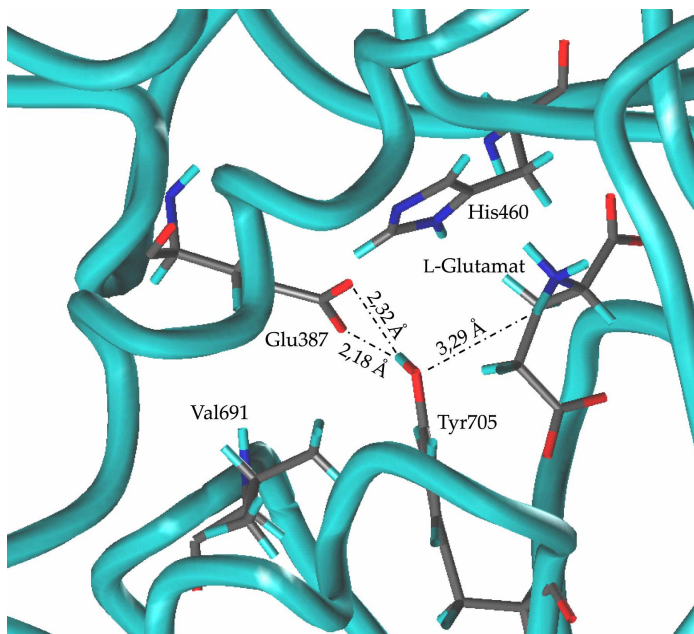


Abb. 24: Eine mögliche Rolle von Glutamat 387 in einem alternativen Strukturmodell. Das gezeigte Modell der Bindungstasche der NR2B-Untereinheit entspricht dem in [55] publizierten und berücksichtigt die sich aus Mutageneseversuchen ergebende Beteiligung von Tyrosin 705 (708 in NR2A) an der Ligandenbindung. In diesem Modell fungiert die γ -Carboxygruppe von E387 als Akzeptor für das Proton der Hydroxygruppe an Y705, wodurch dessen π -Ring-system und damit seine Wechselwirkung mit der Ammoniumgruppe des Liganden stabilisiert wird.

In diesem Modell besteht eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der γ -Carboxygruppe von Glutamat 387 und der Hydroxygruppe von Tyrosin 705, wodurch die negative Partialladung des π -Elektronensystems erhöht wird. Glutamat 387 hätte demnach über die Verstärkung der Wechselwirkung zwischen Tyrosin 705 und Glutamat indirekt Auswirkung auf die Ligandenbindung.

3.3 NR1/NR2A(K459E)

Wie Glutamat 387 liegt auch Lysin 459 an einer Kontaktfläche der S1- mit der S2-Domäne. Auch dieser Rest bildet im Strukturmodell keine Wechselwirkungen mit dem Agonisten in der Bindungstasche aus. Anders als für E387 läßt sich aber im Modell ein wahrscheinlicher Partner für eine Wechselwirkung mit S2 identifizieren. Es handelt sich hierbei um Asparagin 665 (Asn 662 in NR2B), das über seinen Seitenketten-Carbonylsauerstoff eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Ammoniumgruppe von Lysin 459 auszubilden scheint (s. Abbildung 25).

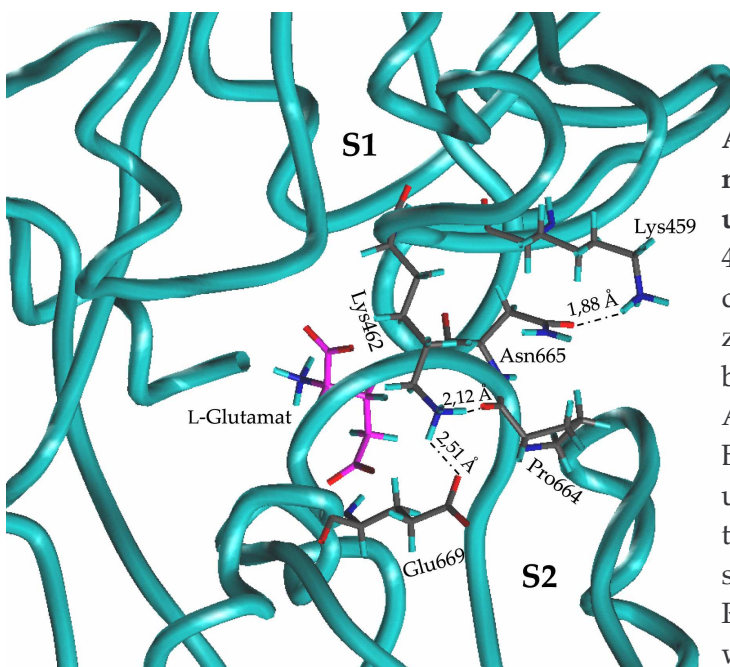


Abb. 25: Lysin 459 und Interaktionen zwischen den Teildomänen S1 und S2. Dem Modell nach ist Lysin 459 einer von fünf Resten, die in diesem Bereich die Wechselwirkung zwischen S1 und S2 vermitteln. Es bildet eine Wasserstoffbrücke mit Asparagin 665 aus. Weitere H-Brücken bestehen zwischen Lysin 462 und der γ -Carboxygruppe von Glutamat 669 sowie dem Carbonylsauerstoff von Prolin 664. Keiner dieser Reste steht in direkter Wechselwirkung mit dem Liganden.

Diese Wechselwirkung ist dem Modell nach eine von zweien in diesem Bereich der S1/S2-Kontaktfläche. Die andere kommt zwischen den hier nicht untersuchten Resten Lysin 462 und Glutamat 669 sowie dem Carbonylsauerstoff von Prolin 664 zustande. Sowohl Lysin 459 als auch Asparagin 665 sollten der Modellvorstellung nach also an der Kanalöffnung beteiligt sein. Die Mutation von Lysin 459 zu Glutamat, die eine Ladungsumkehr an dieser Position zur Folge hat, ist allerdings mit einer so starken Erhöhung des EC_{50} (81 ± 10 , $p < 0,01$) verbunden, daß diese bei unveränderter Affinität nur durch eine Reduzierung der Offenwahrscheinlichkeit auf beinahe Null zu erklären wäre. Von daher ist anzunehmen, daß sowohl K_D - als auch p_o -Änderungen einen Beitrag zur Gesamtwirkung der Mutation leisten. In der Tat

zeigen die kinetischen Parameter diesen doppelten Effekt. Neben Änderungen in k_{on} und k_{off} , die zusammen zu einer etwa siebenfachen Verringerung der Affinität führen, ist auch eine Erhöhung von k_{cl} nachweisbar, sodaß sich insgesamt eine 11-fache Erhöhung des EC_{50} -Werts ergibt.

3.4 NR1/NR2A(N665D)

Wie oben angesprochen ist Asparagin 665 dem Modell nach der Partner für die Wechselwirkung mit Lysin 459 in der S2-Domäne. Nachdem für die Rezeptoren mit der Mutation K459E eine deutliche Reduzierung der Offenwahrscheinlichkeit nachgewiesen werden konnte, sollte durch eine Mutation an Position 665 versucht werden, eine Erhöhung von p_o zu erreichen. Substitution von Asparagin durch Aspartat, d.h. Austausch der Carbonyl- gegen eine Carboxylgruppe, macht die Seitenkette zu einem besseren Elektronendonator. Aspartat sollte daher eine stärkere Wasserstoffbrückenbindung mit Lysin 459 ausbilden können als Asparagin. Das Strukturmodell unterstützt alternativ hierzu die Ausbildung einer weiteren H-Brücke zwischen Asp665 und Asn469 (Abbildung 26 oben). Beide Möglichkeiten sollten jedoch zu einer stabileren Wechselwirkung zwischen der S1- und S2-Domäne führen. Die im Vergleich zum wt bessere Wechselwirkung ist beim Vergleich raumfüllender Darstellungen der S1/S2-Kontaktfläche in der wt- und der mutierten Untereinheit deutlich an der kompakteren Verzahnung der beteiligten Reste im Fall der N665D-Mutante zu erkennen (Abbildung 26 unten).

Makroskopisch zeigen die mutanten Rezeptoren eine geringfügig höhere Affinität als der wt-Rezeptor ($EC_{50} = 2,5 \pm 1,7 \mu M$). Die kinetische Untersuchung zeigt jedoch, daß dieser leichten Änderung eine deutlich erhöhte Offenwahrscheinlichkeit zugrunde liegt, die ihrerseits durch eine um etwa eine Größenordnung reduzierte Schließrate bedingt ist. Die wahre Affinität des Rezeptors bleibt dagegen durch die Mutation weitgehend unverändert. Damit entspricht die Auswirkung der Mutation genau der Erwartung, die in einer Stabilisierung des geschlossenen Zustandes der Bindungsdomäne und damit des offenen Zustands des Kanals besteht.

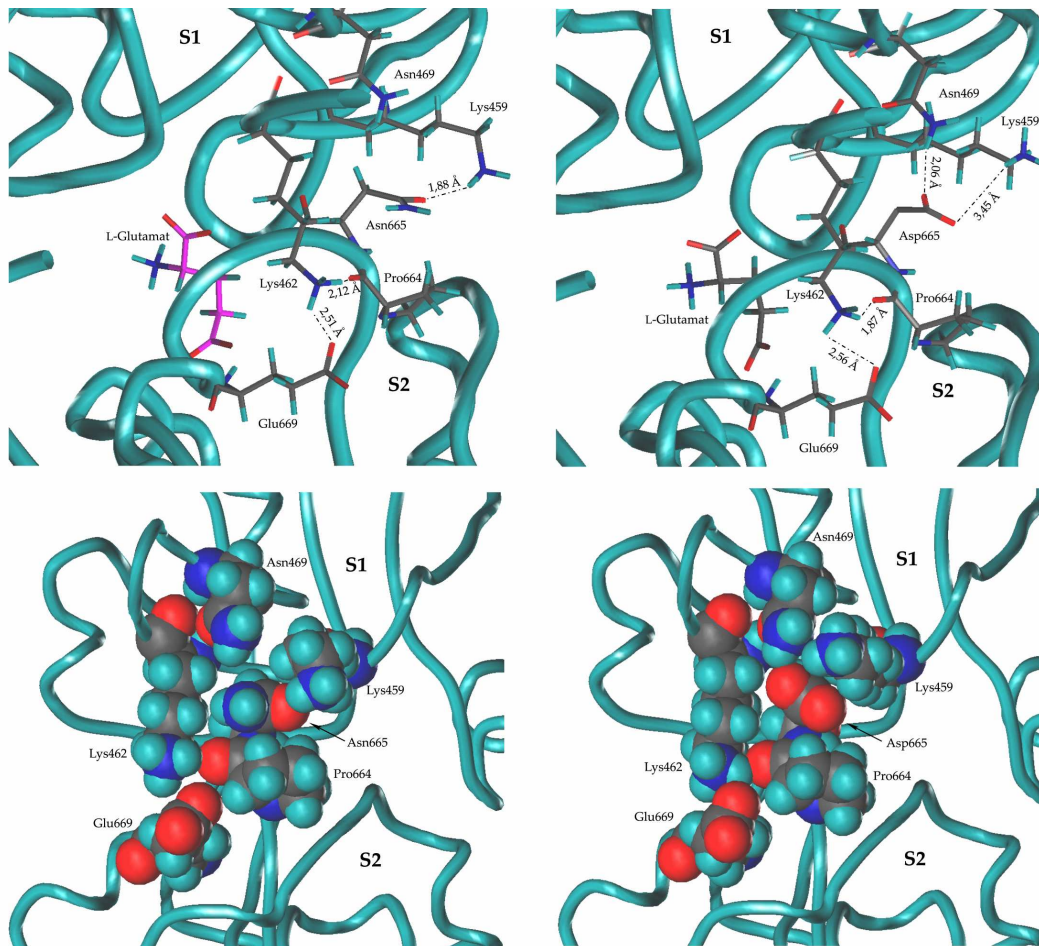


Abb. 26: Durch das Strukturmodell vorhergesagte Auswirkung von Mutation N665D.
obere Reihe: Stabmodelle der wt- (links, wie in Abbildung 25) und der mutierten Bindungsdomäne (rechts). In der Mutante kann die Carboxygruppe des Aspartats eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung mit Asparagin 469 eingehen. **untere Reihe:** die raumfüllende Darstellung der um 90° gedrehten Modelle zeigt, daß die in der mutanten Untereinheit stärkere Wechselwirkung eine Annäherung der S1- und S2-Domäne bewirkt. Die Interaktionsfläche erscheint kompakter.

3.5 NR1/NR2A(K459N) und NR1/NR2A(N665K)

Die Mutationen K459N und N665K wurden mit dem Ziel charakterisiert, genauere Einblicke in die Rolle der offenbar an der Kanalaktivierung beteiligten Reste 459 und 665 zu gewinnen. Interagieren diese beiden Reste im geschlossenen Zustand der Bindungstasche wirklich miteinander, dann sollte die Mutation N665K ähnlich K459E diese Wechselwirkung zerstören. Für K459N wurde dagegen eine möglicherweise höhere Offenwahrscheinlichkeit als für wt-Rezeptoren erwartet, da einerseits zwei Asparaginseitenketten in der Regel gut miteinander wechselwirken können

und andererseits Asparagin wesentlich kleiner als Lysin ist, wodurch die Interaktion die S1- und S2-Domäne in der Mutante näher zusammenführen sollte als im wt.

Beide Mutationen entsprechen den Erwartungen teilweise. N665K-Rezeptoren weisen tatsächlich eine verringerte Öffnungsrate auf, die sich auch in einer reduzierten Offenwahrscheinlichkeit widerspiegelt. Der Effekt ist allerdings nicht größer als der der Mutation K459E, was aufgrund der Größe der Lysinseitenkette eigentlich erwartet worden war. Möglicherweise kann K665 aber seine Seitenkette von der S1-Domäne weg ausrichten, so daß es nicht zu sterischer Behinderung des Schließvorgangs kommt.

K459N-Rezeptoren zeigen insgesamt nur sehr geringe Unterschiede zum wt. Allerdings ist tatsächlich die Schließrate leicht, wenn auch nicht signifikant, reduziert, was zu einer geringfügigen, aber gleichfalls nicht signifikanten, Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit führt. Trotz dieses geringen Effekts bestätigt die Mutation aber die Ergebnisse mit K459E, wie besonders bei der ϕ -Wertanalyse in der Diskussion deutlich wird.

4. Einzelkanalmessungen an wt- und NR1/NR2A(N665D)-Rezeptoren

Einzelkanalmessungen stellen prinzipiell eine alternative Methode zur Bestimmung von Offenwahrscheinlichkeiten dar (s. IV.1) und können zur Kontrolle der Ergebnisse aus Photolyseversuchen eingesetzt werden. Generell sind Einzelkanalmessungen allerdings mit vergleichsweise hohem experimentellen Aufwand verbunden, wozu speziell für NMDA-Rezeptoren noch die Komplexität der Aktivierung auf Einzelkanalniveau kommt. Wegen dieser Schwierigkeiten, die im Diskussionsteil (IV.1) ausführlich dargestellt werden, wurde von den vorgestellten Mutationen nur N665D auf ihre Auswirkungen auf Einzelkanalströme untersucht. Ausgewählt wurde gerade diese Mutation, weil die durch sie verursachte starke Verringerung der Schließrate, die sich aus den Photolysedaten ergibt, auch bei einem Vergleich von Einzelkanalströmen von wt- und mutanten Rezeptoren leicht nachweisbar sein sollte.

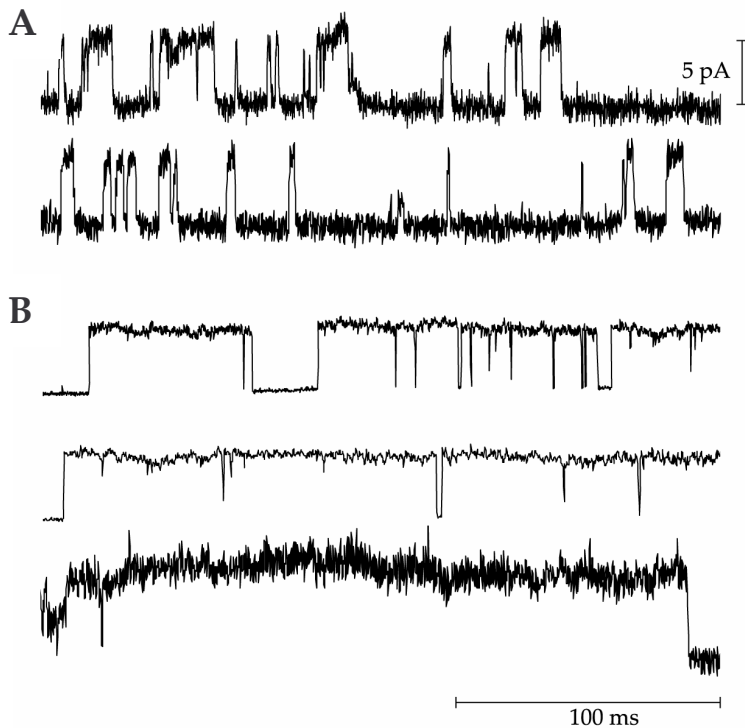


Abb. 27: Einzelkanalströme von (A) NR2Awt- und (B) N665D-Rezeptoren. Die Messungen erfolgten in der *inside out*-Konfiguration bei +100 mV. (A) und (B) sind im selben Maßstab dargestellt. Es ist klar zu sehen, daß die Mutation die Dauer von Öffnungsereignissen verlängert. Die Ströme in (A) stammen von einem *patch*, die in (B) von verschiedenen.

Abbildung 27 zeigt repräsentative Ausschnitte aus Einzelkanalmessungen an wt- und NR2A(N665D)-Rezeptoren. Bereits bei bloßer Betrachtung der Ströme wird deutlich, daß die mutanten Rezeptoren, wie bei einer niedrigeren Schließrate zu erwarten, deutlich längere Offenzeiten des Kanals aufweisen als wt-Rezeptoren. Einschränkend muß aber gesagt werden, daß nur etwa die Hälfte der untersuchten mutanten Einzelkanäle (4 von 10 *patches*, ab hier als Typ 1 bezeichnet) diese auffällige Charakteristik zeigte, während die übrigen (Typ 2) augenscheinlich dem wt glichen. Für 3 wt-*patches* und jeweils 3 *patches* des mutanten Rezeptors vom Typ 1 und 2 wurde eine quantitative Analyse durchgeführt. In allen drei Fällen ergibt sich eine Haupt-Einzelkanalleitfähigkeit von etwa 50 pS (wt: 51 ± 3 pS, Mutante Typ 1: 54 ± 3 pS, Mutante Typ 2: 45 ± 2 pS), was gut mit dem Literaturwert für in HEK-Zellen exprimierte NR1/NR2A-Rezeptoren von 51 pS [87] übereinstimmt. Verteilungen der Offen- und Verschlossenzeiten von NR1/NR2A-Rezeptoren lassen sich der Literatur nach adäquat durch eine (Offen-) bzw. die Summe aus fünf (Verschlossenzeiten) exponentiellen Komponenten beschreiben ([98],[87]). Die Literaturwerte der entsprechenden Zeitkonstanten für in HEK-Zellen exprimierte Rezeptoren [87], sind in Tabelle 6 denen gegenübergestellt, die hier für wt- und mutante Rezeptoren

bestimmt wurden. Aufgrund der verwendeten Abtastrate bei der Aufzeichnung der eigenen Messungen (s. II.2.4.4) sind Ereignisse, die der schnellsten Zeitkonstante der Verschlusszeiten der Literatur entsprechen, in den hier gemessenen Daten stark unterrepräsentiert. Die Verteilung der Verschlusszeiten lässt sich daher mit vier Komponenten (τ_{2-5} in Tabelle 6) beschreiben.

	wt	N665D (Typ 1)	N665D (Typ 2)	Literatur [87]
Verschlusszeiten				
$\tau_1 / \mu\text{s}$	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt	$38,9 \pm 4,4$
τ_2 / ms	$0,68 \pm 0,31$	$0,50 \pm 0,23$	$0,45 \pm 0,09$	$0,54 \pm 0,04$
τ_3 / ms	$8,4 \pm 3,4$	$4,3 \pm 0,5$	$8,9 \pm 0,4$	$9,9 \pm 1,3$
τ_4 / ms	$86,9 \pm 27,7$	$47,0 \pm 14,0$	$80,4 \pm 5,5$	$393,5 \pm 59,1$
τ_5 / ms	nicht bestimmt	1206 ± 451	1750 ± 927	938 ± 83
Offenzeiten				
τ / ms	$2,17 \pm 0,14$	$53,9 \pm 27,2^*$	$2,15 \pm 0,08$	$2,23 \pm 0,06$

Tab. 6: Offen- und Verschlusszeiten von NR2Awt- und NR2A(N665D)-Rezeptoren. Die aus der Verteilung der Verschlusszeiten erhaltenen Zeitkonstanten unterscheiden sich zwischen wt- und N665D-Rezeptoren (Typ 1 und 2) nicht signifikant. N665D-Rezeptoren des Typs eins weisen aber signifikant längere Offenzeiten als wt-Rezeptoren und mutante Rezeptoren des Typs 2 auf. Die Werte basieren auf den Daten von jeweils drei *patches* verschiedener Zellen. Die Literaturwerte beziehen sich auf ebenfalls in HEK-Zellen exprimierte NR1/NR2A-Rezeptoren. Zu beachten ist die Abhängigkeit der Zeitkonstanten τ_4 und τ_5 von der Ligandenkonzentration, die für die eigenen Messungen 100 nM (Glutamat) und 20 μM (Glyzin), in [87] 300 nM (Glutamat) und 10 μM (Glyzin) betrug. τ_1 konnte für die eigenen Messungen aus dem im Text genannten Grund nicht bestimmt werden, τ_5 für wt-Rezeptoren aufgrund eines technischen Fehlers (Aufteilung der gespeicherten Messungen in Dateien zu geringer Größe).

Wie zu sehen ist, entsprechen die für wt-Rezeptoren bestimmten Zeitkonstanten für die Offenzeit und die der beiden schnellsten Komponenten der Verschlusszeitenverteilung nahezu den Literaturwerten. Die beiden langsamsten Komponenten der Verschlusszeitenverteilung sind bekanntermaßen ([37],[98],[3]) von den eingesetzten Ligandenkonzentrationen abhängig und können nur bedingt mit der Literatur verglichen werden.

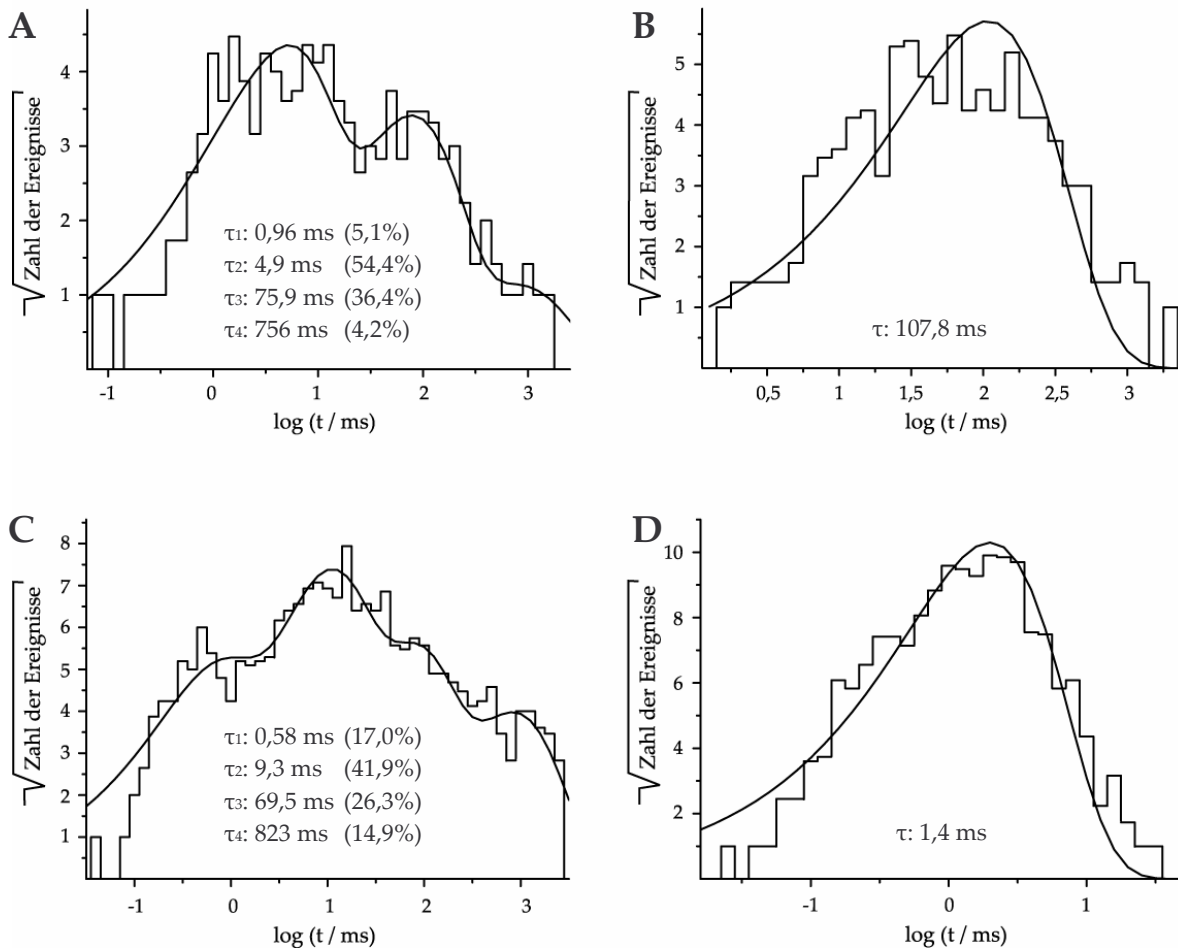


Abb. 28: Histogramme der Verschluss- und Offenzeitenverteilungen für einen mutanten Rezeptor des Typs 1 (oben) und einen wt-Rezeptor (unten).

A und **C**: Die Verteilungen der Verschlusszeiten ähneln sich und lassen sich für beide Rezeptoren durch die Summe aus 4 exponentiellen Komponenten beschreiben (Kurven).

B und **D**: Zur Beschreibung der Offenzeitenverteilungen ist jeweils eine Komponente ausreichend. Die Verteilung ist aber insgesamt für den mutanten Rezeptor gegenüber dem wt stark verschoben (unterschiedliche Ausschnitte der x-Achse in (B) und (D)).

Zu den Histogrammen in (A)-(D) sind jeweils die sich aus den Anpassungen ergebenden Zeitkonstanten mit ihrem Flächenanteil an der Gesamtanpassung aufgeführt.

Deutlich wird auch, daß die mutanten Rezeptoren des Typs 2 nicht nur dem Eindruck nach, sondern tatsächlich auch quantitativ ununterscheidbar von wt-Rezeptoren sind. Mutante Rezeptoren des Typs 1 dagegen zeigen zwar gleichfalls keine signifikanten Unterschiede zum wt bezüglich der Komponenten der Verschlusszeitenverteilung, unterscheiden sich aber klar in der Verteilung der Offenzeiten (s. auch Abbildung 28). Für wt-Rezeptoren sind ebenfalls seltene, hier nicht beobachtete, Phasen hoher Offenwahrscheinlichkeit beschrieben, diese sind jedoch durch kürzere Verschlusszeiten bei gleichbleibenden Offenzeiten bedingt

([37],[87]) und damit deutlich verschieden von den mit mutanten Rezeptoren des Typs 1 auftretenden Kinetiken.

Bemerkenswert ist, daß die aus der Zeitkonstanten der Offenzeitenverteilung errechenbare Einzelkanalschließrate mit der aus den Photolyseversuchen erhaltenen Schließrate im Fall von wt-Rezeptoren wenigstens annähernd ($470 \pm 30 \text{ s}^{-1}$ gegenüber $240 \pm 50 \text{ s}^{-1}$), für die Mutante (Typ 1) vollständig ($30 \pm 12 \text{ s}^{-1}$ gegenüber $30 \pm 8 \text{ s}^{-1}$) übereinstimmt. Ein Vergleich der Öffnungsrate aus Photolyseversuchen mit Einzelkanalmessungen ist dagegen wegen der Komplexität der Verschlossenzeitenverteilung nicht ohne weiteres möglich.

Insgesamt bestätigen die Einzelkanalmessungen (des Typs 1) die Ergebnisse der Photolyseversuche zur Mutation NR2A(N665D). Unklar ist aber die Natur des Typs 2 der mutanten Rezeptoren. Ausgeschlossen werden kann eine Verunreinigung der exprimierten cDNA, da Rezeptoren des Typs 1 und 2 auch nach deren erneuter Klonierung und Aufreinigung im selben Transfektionsansatz auftraten, eine befriedigende Erklärung für das Auftreten von Typ 2 kann zur Zeit aber nicht gegeben werden. Klar ist dagegen, daß, sollten beide Typen auch in *whole cell*-Messungen und damit in den Photolyseversuchen auftreten, der dort gemessene Gesamtstrom aufgrund der hohen Offenwahrscheinlichkeit bei weitem durch Typ 1 dominiert würde.

IV. Diskussion

Die im vorhergehenden Teil vorgestellten Ergebnisse lassen sich in folgenden Stichpunkten zusammenfassen:

1. es konnte eine Methode zur kinetischen Charakterisierung von NMDA-Rezeptoren ausgehend von *whole cell*-Strömen etabliert werden.
2. kinetische Parameter der Aktivierung von wt-Rezeptoren konnten unter verschiedenen Bedingungen charakterisiert werden.
3. die Untersuchung von Rezeptoren mit Mutationen im Bereich der Ligandenbindungsdomäne zeigt in mehreren Fällen Auswirkungen auch auf die Kanalöffnung.
4. es wurde eine *gain of function*-Mutation (N665D) identifiziert, die zu einer Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit des Kanals führt.

An diesen Punkten orientiert sich gleichzeitig der Aufbau dieser Diskussion, deren Abschnitte sich jeweils mit einem der vier folgenden Aspekte befassen:

erstens der verwendeten Methode hinsichtlich ihrer Vor- und Nachteile im Vergleich zu anderen möglichen Ansätzen zur Bestimmung von Rezeptorkinetiken sowie der Gültigkeit des zugrunde gelegten kinetischen Modells, zweitens den Ergebnissen an wt-Rezeptoren insbesondere im Vergleich zur Literatur, drittens den Ergebnissen an mutanten Rezeptoren und ihrer Einordnung in das einleitend dargestellte Modell der Rezeptoraktivierung, sowie schließlich viertens einer Einschätzung der Ergebnisse zur Mutation N665D und ihrer Anwendungsmöglichkeiten.

1. Beurteilung des methodischen Ansatzes

1.1 Vergleich mit alternativen Methoden

Die Analyse von Rezeptorkinetiken kann prinzipiell mikroskopisch anhand von Einzelkanalmessungen oder makroskopisch auf der Ebene mehrerer Kanäle erfolgen. Dabei ist der potentielle Informationsgewinn aus Einzelkanalmessungen sicherlich am höchsten, aber auch mit dem größten Arbeitsaufwand verbunden. Einzelkanalmessungen erlauben die direkte Bestimmung von Kanalleitfähigkeiten, außerdem können aus Offen- und Verschußzeiten der Kanäle, sowie deren Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration, Öffnungs- und Schließraten ebenso wie Bindungs- und Dissoziationsraten ermittelt werden. Die einzige makroskopisch meßbare Größe, der Strom als Funktion der Zeit und der eingesetzten Ligandenkonzentration, kann durch Summierung mehrerer Einzelkanalmessungen ebenfalls rekonstruiert werden. Die Vielzahl der meßbaren Parameter führt auch dazu, daß kinetische Modelle durch Einzelkanaldaten sehr gut überprüfbar sind. Generell kann gesagt werden, daß das Ergebnis jedes makroskopischen Experimentes, das ja prinzipiell lediglich eine Summierung zahlreicher mikroskopischer Messungen darstellt, auch aus entsprechenden Versuchen auf Einzelkanalniveau erhalten werden kann, daß diese Versuche aber zudem Information enthalten, die bei bloßer Betrachtung der makroskopischen Stromsumme verloren gehen. Dieser große Vorteil von Einzelkanalmessungen bringt aber gleichzeitig ihren Nachteil mit sich. Weil jede makroskopische Messung einer großen Zahl summierter Einzelkanalmessungen entspricht, wird von letzteren eine ungleich größere Zahl benötigt, um statistisch ähnlich verlässliche Aussagen zu ermöglichen. Erhöht wird der Aufwand außerdem durch die Notwendigkeit *patches* zu ziehen und das Signal-Rauschverhältnis zu optimieren. Speziell im vorliegenden Fall kommt hinzu, daß Einzelkanaldaten von NMDA-Rezeptoren außerordentlich schwierig zu interpretieren sind. Vor allem die Komplexität der Verteilung der beobachteten Geschlossenzeiten, zu deren Erklärung die Existenz von wenigstens fünf geschlossenen Zuständen des Kanals angenommen

werden muß ([37],[86]), sowie das Auftreten von sogenanntem *modal gating* [75], bei dem der Rezeptor zwischen mehreren längeren Phasen mit jeweils eigenen Kanalöffnungseigenschaften wechselt, haben zur Aufstellung teils recht verschiedener und komplexer kinetischer Schemata geführt. Deren mechanistische Grundlagen und physiologische Relevanz sind aber weitgehend unverstanden, wohingegen makroskopische Ströme mit deutlich einfacheren Modellen ([20] und hier) von oft vergleichbarer Aussagekraft aber leichter Interpretierbarkeit beschreibbar sind. Diese Faktoren führen dazu, daß Einzelkanalmessungen für eine Reihenuntersuchung verschiedener Rezeptorvarianten wie in dieser Arbeit trotz ihrer hohen Aussagekraft eher ungeeignet sind und lediglich zur Bestätigung ausgewählter Ergebnisse eingesetzt werden können.

Bei der kinetischen Untersuchung der Aktivierung ligandengesteuerter Ionenkanäle auf makroskopischer Ebene ist es entscheidend, das System schnell, d.h. deutlich schneller als die Teilschritte des Aktivierungsprozesses, mit der jeweiligen Ligandenkonzentration zu äquilibrieren, um dann die Rezeptoraktivierung bei konstanter Ligandenkonzentration zu verfolgen. Gelingt dies nicht, spiegelt der Stromanstieg nicht die intrinsische Kinetik der Kanalaktivierung, sondern die der Ligandenzugabe wider. Um diese nötige schnelle Einstellung der Ligandenkonzentration zu erreichen, stehen wiederum zwei Methoden zur Wahl. Die Methode des schnellen Lösungswechsels besteht einfach darin, die ligandenfreie Badlösung entsprechend schnell gegen die ligandenhaltige Meßlösung auszutauschen, was mittels einer entsprechenden Apparatur mit mehreren schnell und präzise umschaltbaren Lösungszuflüssen bewerkstelligt wird. Die zweite Methode ist die hier verwendete auf photolytischer Freisetzung des Liganden aus einer inaktiven Vorstufe beruhende. Hierbei kommt man mit einem vergleichsweise langsamen Lösungswechsel aus, weil die Äquilibrierung mit der inaktiven Vorstufe noch keine Rezeptoraktivierung auslöst. Der schnelle Sprung in der Konzentration des aktiven Liganden wird durch die intrinsische, schnelle Kinetik der Photolysereaktion gewährleistet. Beide Methoden werden häufig zur Untersuchung ligandengesteuerter Ionenkanäle

benutzt (s. bspw. [19],[20] zum schnellen Lösungswechsel), ihre Vor- und Nachteile sind einander in Tabelle 7 gegenübergestellt.

	schneller Lösungswechsel	photolytische Freisetzung
erreichbare Zeitkonstanten der Ligandenzugabe	200 – 500 μ s	< 1 μ s (NI-Verbindungen: \approx 150 ns)
verwendbare Liganden	keine Einschränkungen	geeignete photolabile Vorstufen müssen verfügbar sein
Versuchsbedingungen	gute Beeinflußbarkeit	eingeschränkte Kontrolle über Ligandenkonzentration
Fehleranfälligkeit	hoch	gering
Meßobjekt	Membran- <i>patch</i>	intakte Zelle

Tab. 7: Vergleich der Methoden des schnellen Lösungswechsels und der photolytischen Freisetzung zur schnellen Ligandenapplikation.

Im Falle von NMDA-Rezeptoren mit ihren eher langsamen Kinetiken spielt der Nachteil etwas langsamerer Einstellung der Ligandenkonzentration mit Lösungswechselsystemen keine Rolle. Die Methode wurde auch bereits erfolgreich zur Untersuchung neuronaler NMDA-Rezeptoren eingesetzt [20]. Größter Nachteil des photolysebasierten Ansatzes ist die Abhängigkeit von der Verfügbarkeit der entsprechenden Ligandenvorstufen. In dieser Arbeit wurde durch Tests an zwei Klassen von *caged compounds* demonstriert, daß sich NI/MNI-geschützte Verbindungen für Untersuchungen an NMDA-Rezeptoren eignen (III.1). Damit standen an NMDA-Rezeptoragonisten L-Glutamat, Glyzin und D-Aspartat, also ein Ligand der NR1- und zwei Liganden der NR2-Untereinheit, als photolysierbare Vorstufen zur Verfügung, von denen allerdings nur die Glutamatderivate NI-Glutamat und MNI-Glutamat kommerziell und damit praktisch in beliebiger Menge erhältlich sind. Ein weiterer Nachteil der Photolysemethode besteht in der geringeren Kontrolle über die Versuchsbedingungen. So ist es nicht möglich, die Ligandenkonzentration über einen längeren Zeitraum hinweg konstant zu halten, weil diese nach der einmaligen Freisetzung diffusionsbedingt oder wie hier aufgrund des aktiven Lösungswechsels abnimmt. Es war daher in dieser Arbeit nicht möglich,

Desensitisierungsvorgänge zu analysieren, weil diese langsamer als die Konzentrationsabnahme sind (II.2.5.3). Während es sich hier also um eine echte Einschränkung handelt, kann das Problem der Bestimmung der freigesetzten absoluten Ligandenkonzentration wie unter II.2.5 dargestellt durch Kalibrierung anhand von Dosis-Wirkungskurven und einer sorgfältigen Bestimmung der Laserenergie gelöst werden. Als eindeutige Vorteile des Photolyseansatzes können die geringe Fehleranfälligkeit und die Möglichkeit zu *whole cell*-Messungen genannt werden. Nach Auswahl der photolabilen Ligandenvorstufen ist deren Freisetzungsrate durch ihre photochemischen Eigenschaften vorgegeben, d.h. die Geschwindigkeit der Ligandenfreisetzung kann in einzelnen Experimenten als weitgehend konstant und gut definiert angesehen werden. Dagegen muß die Geschwindigkeit des Lösungswechsels in Systemen, die auf schnellem Austausch von Lösungen basieren, beständig kontrolliert werden, um ihr Ausreichen sicherzustellen. Daneben kann die erforderliche Geschwindigkeit des Lösungswechsels mit diesen Systemen nur unter Verwendung von *patches* erzielt werden, weil das Überspülen ganzer Zellen mit der neuen Lösung zu viel Zeit beanspruchen würde. Bei der Verwendung der Photolysemethode stellt die Messung in der *whole cell*-Konfiguration dagegen kein Problem dar. Derartige Messungen sind technisch einfacher zu realisieren und bieten durch Summierung der Antworten einer größeren Zahl von Rezeptoren die bereits beschriebenen Vorteile größerer Ströme, und damit eines besseren Signal-Rauschverhältnisses, sowie einer geringeren statistischen Schwankungsbreite der Ergebnisse.

1.2 Anmerkungen zum verwendeten kinetischen Modell

Das unter II.2.5.3 in Abbildung 11 gezeigte kinetische Modell der Aktivierung von NMDA-Rezeptoren bildet die Grundlage der gesamten Datenauswertung in dieser Arbeit. Es ist deshalb von besonderer Wichtigkeit, seine Gültigkeit zu überprüfen. Das Modell geht von insgesamt vier Ligandenbindungsstellen pro NMDA-Rezeptor aus, von denen zwei Glyzin und zwei Glutamat binden. Diese Annahme wird durch

verschiedene Untersuchungen gestützt. Die Kristallstrukturen der Ligandenbindungsdomänen verschiedener iGluR-Untereinheiten zeigen eindeutig die Bindung jeweils eines Moleküls Ligand pro Bindungsdomäne ([6],[35], u.a.). Der Aufbau des Rezeptors aus vier Untereinheiten ist nicht endgültig bewiesen, möglich wäre auch eine pentamere Struktur ([33],[76]), ist aber aufgrund mehrerer unabhängiger Untersuchungen ([54],[61],[82]) als sehr wahrscheinlich anzusehen. Damit stehen vier potentielle Ligandenbindungsstellen pro Rezeptor zur Verfügung. Gezeigt ist weiter, daß die gleichzeitige Bindung beider Agonisten nötig für die Kanalöffnung ist [24].

Die zweite Annahme ist, daß eine Öffnung des Ionenkanals nur nach Besetzung aller vier Bindungsstellen erfolgen kann. Für einen AMPA-Rezeptor (GluR3) konnte aber nachgewiesen werden, daß Öffnungen des Kanals bereits nach Bindung nur eines Ligandenmoleküls auftreten können, sich mit zunehmender Zahl gebundener Ligandenmoleküle aber stufenweise die Kanalleitfähigkeit erhöht [79]. Für NMDA-Rezeptoren konnte zwar bereits früher durch kinetische Analyse der Rezeptoraktivierung bei niedrigen Ligandenkonzentrationen gezeigt werden, daß mehr als je ein Molekül Glyzin und Glutamat zur Aktivierung erforderlich sind [20], allerdings wurde dort die Möglichkeit nicht untersucht, daß partiell ligandierter Rezeptoren analog GluR3-Rezeptoren einen offenen Zustand mit geringerer Leitfähigkeit als vollständig ligandierter einnehmen könnten. Eigene Simulationen unter Verwendung der vorgestellten Daten schließen jedoch auch diesen Fall aus. In Abbildung 29 ist nochmals exemplarisch eine Parameteranpassung auf Grundlage des in der Arbeit verwendeten Modells an die Stromantworten einer Zelle gezeigt. Zum Vergleich ist dazu die bestmögliche Anpassung unter Verwendung eines erweiterten Modells mit Öffnungen partiell ligandierter Zustände dargestellt. Die bessere Übereinstimmung des hier benutzten Modells mit den Daten ist auch statistisch belegbar. Die Abweichung (Summe der Fehlerquadrate) zwischen theoretischen und beobachteten Strömen beträgt im Mittel (3 Zellen) für das hier verwendete Modell weniger als zwei Drittel ($0,62 \pm 0,11$ **) der mit dem erweiterten Modell auftretenden. Auch wenn

die prinzipielle Möglichkeit der Öffnung partiell ligandierter Rezeptoren auf diesem Weg nicht ausgeschlossen werden kann, wird doch klar, daß dieser Vorgang keinen signifikanten Beitrag zum Gesamtstrom leisten kann. Die Annahmen des Modells zur Zahl der notwendigen Ligandenbindungsschritte scheinen damit insgesamt recht gut abgesichert.

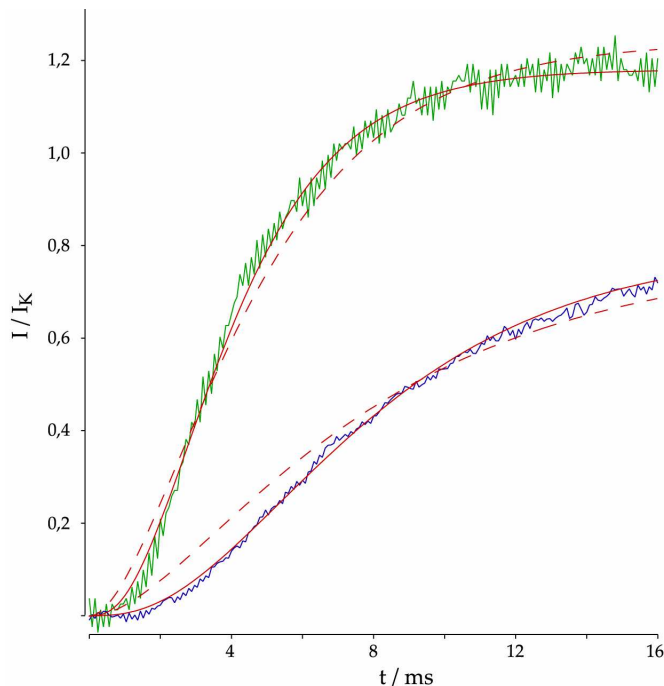


Abb. 29: Vergleich kinetischer Modelle der Rezeptoraktivierung I. Gezeigt sind zwei Stromantworten einer Zelle (grün: 7,5 μ M, blau: 3,7 μ M Glutamat). Die durchgehenden roten Kurven stellen die beste mit dem Aktivierungsmodell dieser Arbeit erhaltene Anpassung dar, die unterbrochenen Kurven diejenigen für ein alternatives Modell, in dem auch partiell ligandierter Rezeptorpopulationen öffnen können. Da die Bindung von sowohl Glutamat als auch Glyzin zur Kanalöffnung absolut erforderlich ist [24], verbleiben als derartige Populationen lediglich RL1L2, RL1₂L2 und RL1L2₂, in denen jeweils wenigstens ein Molekül jedes Liganden gebunden ist. Von diesen Populationen

wurde für die Simulation angenommen, daß ihrer Kanalaktivierung jeweils dieselbe Öffnungs- und Schließrate wie dem vollständig Rezeptor (RL1₂L2₂) zugrunde liegt, ihre Kanalleitfähigkeiten aber analog GluR3-Rezeptoren [79] jeweils nur halb so groß sind. Es ist deutlich zu erkennen, daß das so modifizierte Modell wesentlich schlechter mit den Daten übereinstimmt als das ursprüngliche. Grund ist vor allem eine weniger stark ausgeprägte *lag*-Phase, weshalb die Abweichung für niedrige Konzentrationen, bei denen die *lag*-Phase die Stromantwort dominiert, auch stärker ist.

Weiterhin wird im Modell angenommen, daß keine Kooperativität zwischen den Ligandenbindungsstellen besteht. Dies steht im Widerspruch zu veröffentlichten Daten ([56],[77]), die auf negative Kooperativität zwischen den Glyzin- und Glutamatbindungsstellen hindeuten. Eine Erweiterung des Modells um diese Möglichkeit würde jedoch die Einführung wenigstens vier neuer Ratenkonstanten, Glyzinbindungs- und -dissoziationsraten in Gegenwart von Glutamat und umgekehrt, erforderlich machen, die anhand der vorliegenden Daten nicht mehr eindeutig

bestimmbar wären. Die demnach unvermeidliche Vereinfachung führt dazu, daß die ermittelten Bindungs- und Dissoziationsraten in etwa als Mittelwerte möglicherweise unterschiedlicher Einzelraten zu verstehen sind, was aber keine größeren Auswirkungen auf die Interpretation der Ergebnisse hat.

Die letzte Annahme ist die, daß die Kanalöffnung nach Bindung aller vier Ligandenmoleküle in einem Schritt erfolgt. Diese Annahme wird durch eine neuere Untersuchung an Einzelkanälen in Frage gestellt [8]. In dieser Arbeit wird der Schluß gezogen, daß NR1- und NR2-, also glyzin- und glutamatbindende Untereinheiten nach der Ligandenbindung getrennte Konformationsänderungen durchlaufen, die wahrscheinlich dem Schließen der jeweiligen Bindungstaschen entsprechen und beide nötig für die Kanalöffnung sind. Das sich daraus ergebende Modell (Abbildung 30) stellt eine Erweiterung des hier verwendeten um zwei Zustände dar. Entsprechend enthält es zusätzliche Ratenkonstanten, die als Öffnungs- und Schließraten der einzelnen Untereinheiten bezeichnet werden könnten.

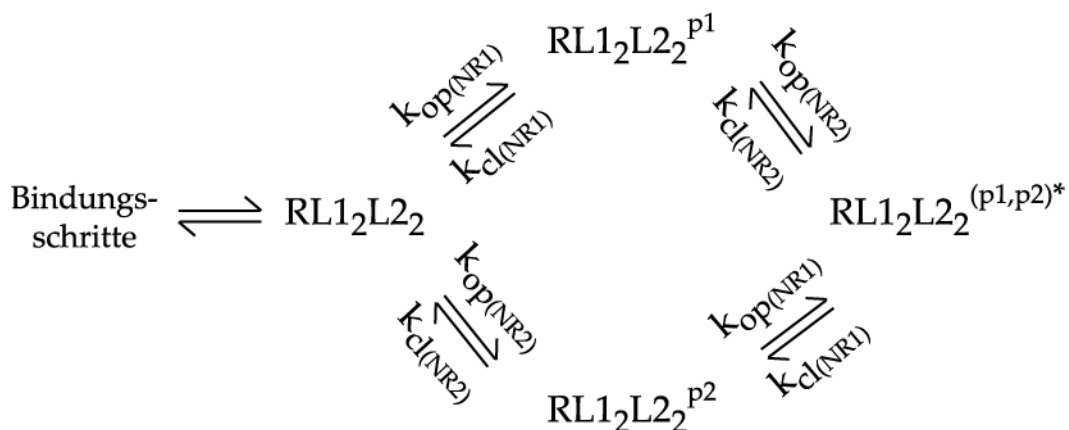


Abb. 30: Ein erweitertes Modell der NMDA-Rezeptoraktivierung (verändert aus [8]).

Anders als im Modell in II.2.5.3 erfolgt die Kanalöffnung nicht in einem Schritt. Sie erfordert vielmehr unabhängige Konformationsänderungen in den NR1- und NR2-Untereinheiten, die diese jeweils in einen für die Kanalöffnung permissiven Zustand (p1 und p2) überführen. Die Teilschritte könnten auch als Aktivierung der einzelnen Untereinheiten aufgefaßt werden, weshalb hier die Ratenkonstanten entsprechend als Öffnungs- ($k_{op(NR1)}$, $k_{op(NR2)}$) und Schließraten ($k_{cl(NR1)}$, $k_{cl(NR2)}$) der Untereinheiten bezeichnet sind.

Im Fall der untersuchten NR1/NR2B-Rezeptoren unterscheiden sich die Öffnungsraten der glyzin- und glutamatbindenden Untereinheiten stark voneinander (1500 s^{-1}

gegenüber 90 s^{-1}). Da die Schließraten annähernd gleich zu sein scheinen (180 s^{-1} und 135 s^{-1}), führt dies zu einer deutlich höheren Offenwahrscheinlichkeit der NR1-Untereinheiten (0,90) verglichen mit den NR2-Untereinheiten (0,40).

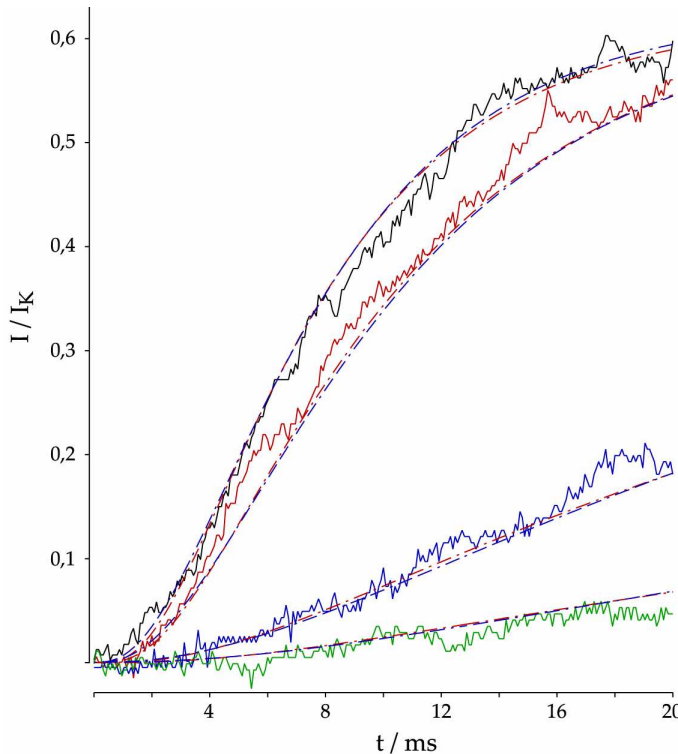


Abb. 31: Vergleich kinetischer Modelle der Rezeptoraktivierung II. Gezeigt sind vier Stromantworten einer NR1/ NR2B-Rezeptoren exprimierenden Zelle. Die roten unterbrochenen Kurven stellen die beste Anpassung an die Daten mit dem Modell dieser Arbeit dar, die blauen die beste mit dem Modell der Abbildung 30. In beiden Fällen ergeben sich praktisch identische Verläufe der theoretischen Ströme, die geringen Unterschiede sind durch Ungenauigkeiten der Anpassung bedingt. Die sich aus dem ursprünglichen Modell ergebenden Parameterwerte sind: $k_{\text{on}} = 18 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{\text{off}} = 20 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{op}} = 244 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{cl}} = 962 \text{ s}^{-1}$. Für das alternative Modell ergibt sich: $k_{\text{on}} = 24 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{\text{off}} = 103 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{op(NR2)}} = 155 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{cl(NR2)}} = 667 \text{ s}^{-1}$. $k_{\text{op(NR1)}}$ und $k_{\text{cl(NR1)}}$ waren auf ihre Literaturwerte [8] von 1557 s^{-1} und 182 s^{-1} fixiert.

Ohne Einzelkanalmessungen ist, wie Abbildung 31 veranschaulicht, eine Auflösung der Teilschritte der Kanalöffnung jedoch nicht möglich. Gesamtzellströme können mit dem in dieser Arbeit verwendeten und dem erweiterten Modell gleich gut beschrieben werden. Wie schon für die Kooperativität der Bindung könnten aber für das erweiterte Modell nicht mehr alle Ratenkonstanten eindeutig bestimmt werden, weshalb für Abbildung 31 $k_{\text{op(NR1)}}$ und $k_{\text{cl(NR1)}}$ auf ihre Werte aus [8] fixiert wurden. Obwohl das neue Modell bisher nicht durch weitere Untersuchungen bestätigt wurde, sollen an dieser Stelle die Konsequenzen abgeschätzt werden, die sich für diese Arbeit ergeben, wenn die Rezeptoraktivierung tatsächlich dem erweiterten kinetischen Schema folgt. Dabei zeigt sich, daß auch für diesen Fall die Aussagekraft der Ergebnisse nicht ernsthaft in Frage gestellt wäre.

Die Offenwahrscheinlichkeit p_o des Kanals ergibt sich für das erweiterte Modell zum einen durch Multiplikation der Einzeloffenwahrscheinlichkeiten der Untereinheiten.

Alternativ kann sie auch analog dem einfachen Modell als $2/(1+k_{cl}/k_{op})$ errechnet werden, wobei k_{op} und k_{cl} die Raten des gesamten Öffnungs- bzw. Schließvorganges darstellen. Diese ergeben sich aus den Teilraten als

$$k_{op} = 1 / (1/k_{op(NR1)} + 1/k_{op(NR2)}) \quad (1) \quad \text{und}$$

$$k_{cl} = k_{cl(NR1)} + k_{cl(NR2)} \quad (2).$$

Die Gesamtöffnungsrate ergibt sich also durch Addition der Zeitkonstanten der Einzelschritte, die Gesamtschließrate durch Addition der Ratenkonstanten. Der Faktor 2 im Ausdruck für p_o berücksichtigt die zwei zur Kanalöffnung führenden Wege.

Aus diesen Überlegungen ergeben sich folgende Schlüsse: da $p_{o(NR1)}$ relativ nahe bei 1 liegt, wird die Gesamtoffenwahrscheinlichkeit weitgehend durch $p_{o(NR2)}$ bestimmt. Für wt-NR1/NR2B-Rezeptoren ergibt sie sich als 0,36. Solange $k_{op(NR1)} \gg k_{op(NR2)}$ wird die Gesamtöffnungsrate gemäß Gleichung 1 beinahe ausschließlich durch $k_{op(NR2)}$ bestimmt. In Abbildung 32 ist die Abhängigkeit der Gesamtöffnungsrate k_{op} von $k_{op(NR2)}$ unter Annahme eines konstanten Wertes für $k_{op(NR1)}$ von 1557 s^{-1} [8] dargestellt.

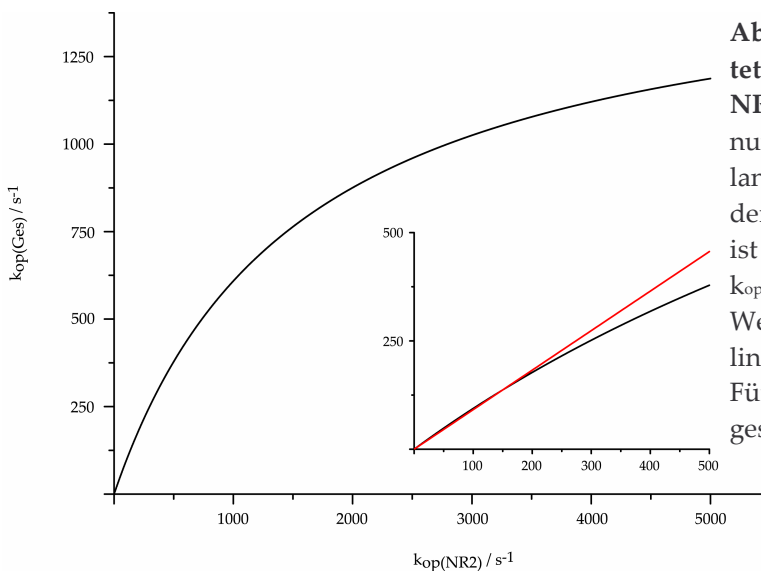


Abb. 32: Abhängigkeit der beobachteten Gesamtöffnungsrate von der NR2-Öffnungsrate. Die Gesamtöffnungsrate wird vorwiegend durch die langsamere der beiden Öffnungsraten der Untereinheiten bestimmt. Gezeigt ist die Abhängigkeit von $k_{op(Ges)}$ von $k_{op(NR2)}$ bei $k_{op(NR1)} = 1557 \text{ s}^{-1}$. Für niedrige Werte von $k_{op(NR2)}$ besteht ein annähernd linearer Zusammenhang (Ausschnitt). Für hohe Werte wird dagegen $k_{op(NR1)}$ geschwindigkeitsbestimmend.

Wie im vergrößerten Ausschnitt erkennbar besteht für $k_{op(NR2)} \leq 250 \text{ s}^{-1}$ eine annähernd lineare Beziehung zwischen den beiden Ratenkonstanten. Dies entspricht Werten von $k_{op} \leq 230 \text{ s}^{-1}$, was in etwa im Bereich der in dieser Arbeit ermittelten Werte liegt. Das Auflösungsvermögen bezüglich Änderungen in k_{op} sollte also durch den konstanten Beitrag von $k_{op(NR1)}$ nicht wesentlich eingeschränkt sein. Zwischen der

Gesamtschließrate k_{cl} und $k_{cl(NR2)}$ besteht eine durchgehend lineare Beziehung, die geometrisch einer Geraden mit Achsenabschnitt $k_{cl(NR1)}$ entspricht. Dies bedeutet, daß mutationsbedingte Änderungen in $k_{cl(NR2)}$ nur proportionale Änderungen in k_{cl} zur Folge haben werden, wenn $k_{cl(NR2)} \gg k_{cl(NR1)}$. In wt-NR1/NR2B-Rezeptoren sind die beiden Teilschließraten jedoch ungefähr gleich groß. Obwohl sich also Änderungen in $k_{cl(NR2)}$ stets in k_{cl} niederschlagen werden, sollte vor allem für Änderungen nach unten das Auflösungsvermögen der Methode beeinträchtigt sein. Das Beispiel der Rezeptoren mit der Mutation N665D mit ihrer sehr niedrigen Schließrate läßt allerdings vermuten, daß die Schließrate der NR1-Untereinheiten entweder in NR1/NR2A-Rezeptoren generell niedriger ist als in NR1/NR2B-Rezeptoren oder daß sie durch die Mutation mitbeeinflußt wird.

Insgesamt bleibt festzuhalten, daß das verwendete Modell der Rezeptoraktivierung, trotz einiger unumgänglicher Vereinfachungen, zur Auswertung verwendet werden kann und eine Interpretation der Ergebnisse mit verhältnismäßig geringen Einschränkungen ermöglicht.

2. Ergebnisse mit wt-NMDA-Rezeptoren

2.1 Vergleich mit anderen Rezeptoren und Literaturwerten

Die kinetischen Parameter von wt-Rezeptoren sind vor allem als Vergleich zu mutanten Rezeptoren von Interesse. Ihre absoluten Werte können aber zudem auch mit Literaturwerten anderer Rezeptoren verglichen werden. Wie in der Einleitung (I.4) beschrieben sind die Aktivierungskinetiken von NMDA-Rezeptoren langsam verglichen mit denen von AMPA- und Kainatrezeptoren. Ebenfalls erheblich schnellere Kinetiken weisen Vertreter der Familie der nikotinischen Acetylcholinrezeptoren auf. Da sich diese Angaben auf jeweils sättigende Ligandenkonzentrationen beziehen, bei denen nicht die Ligandenbindung, sondern die Kanalöffnung ratenlimitierend ist und sich die Ratenkonstante des Stromanstiegs als Summe der Öffnungs- und Schließrate ergibt, sollte diese Summe für NMDA-

Rezeptoren deutlich kleiner als für die anderen angesprochenen Rezeptoren sein. Die kinetischen Parameter einer Reihe dieser Rezeptoren sind bestimmt und in Tabelle 8 mit den hier ermittelten Werten für NR1/NR2A-Rezeptoren verglichen.

	Rezeptorfamilie	k_{op} / s^{-1}	k_{cl} / s^{-1}	p_o	Referenz
NR1/NR2A	iGluR / NMDAR	410	240	0,60	
GluR1	iGluR / AMPAR	29000	2100	0,93	[57]
GluR2	iGluR / AMPAR	80000	2600	0,96	[59]
GluR6	iGluR / AMPAR	11000	420	0,96	[58]
nAChR	nAChR	9400			[63]
GlyR	nAChR	2200	38	0,98	[39]

Tab. 8: Kinetische Eigenschaften verschiedener ligandengesteuerter Ionenkanäle.

Sämtliche Daten stammen aus Untersuchungen mit photolytischer Ligandenfreisetzung.

Die Summe von Öffnungs- und Schließrate des schnellsten Rezeptors GluR2 beträgt mehr als $80000 s^{-1}$, die des langsamsten, des Glyzinrezeptors ($\alpha 1$ -Homomer), immerhin über $2000 s^{-1}$. Dies ist mehr als das Hundert-, bzw. etwa das 3,5-fache des hier für NMDA-Rezeptoren bestimmten Wertes. Auffällig sind außerdem die hohen Offenwahrscheinlichkeiten ($> 0,9$) der aufgeführten Rezeptoren verglichen mit den für NMDA-Rezeptoren erhaltenen Werten von 0,60 (NR1/NR2A) und 0,69 (NR1/NR2B). Dies stimmt qualitativ ebenfalls mit der Literatur überein, wo allgemein von einer vergleichsweise niedrigen Offenwahrscheinlichkeit von NMDA-Rezeptoren ausgegangen wird ([42],[20]). Allerdings handelt es sich bei Literaturangaben häufig um Schätzwerte oder um indirekt bestimmte Werte. Zudem beziehen sich die meisten Angaben auf endogene Rezeptoren neuronaler Zellen, bei denen es sich in aller Regel um Mischpopulationen von Rezeptoren unterschiedlicher Untereinheitenzusammensetzung handeln dürfte. Entsprechend den großen experimentellen Unterschieden schwanken die Literaturwerte für p_o von „NMDA-Rezeptoren“ sehr stark zwischen Minimalwerten von nahe Null bis zu Maximalwerten von etwa 0,5.

In der bereits unter IV.1 angesprochenen Arbeit von Banke und Traynelis [8] allerdings wurden heterolog in HEK293-Zellen exprimierte NR1/NR2B-Rezeptoren detailliert untersucht. Die Bestimmung von p_o aus Einzelkanaldaten ergab dort 0,17, wobei es sich aber um den real beobachteten, durch Desensitisierung beeinflussten Wert handelt. Da die Desensitisierung von NMDA-Rezeptoren in isolierten Membran-*patches* besonders ausgeprägt ist [56], hat sie einen recht großen Einfluß auf die beobachtete Offenwahrscheinlichkeit. Deren theoretischer Wert ohne Desensitisierung ergibt sich aus den in der Arbeit bestimmten Werten der Öffnungs- und Schließraten der NR1- und NR2-Untereinheiten zu 0,36 (vgl. IV.1.2). Dies liegt immer noch deutlich unter dem hier bestimmten Wert von 0,69. Neben den jeweiligen experimentellen Ungenauigkeiten bei der Bestimmung könnte dieser Abweichung möglicherweise auch ein tatsächlicher Unterschied in der Offenwahrscheinlichkeit zwischen Rezeptoren in *patches* und in der Membran intakter Zellen zugrunde liegen. Von der selben Arbeitsgruppe in Posterform präsentierte erste Daten zur Kinetik von NR1/NR2A-Rezeptoren [31] ergeben für p_o einen Wert von ca. 0,5. Die Abweichung zwischen den Ergebnissen wäre demnach für den 2A-Subtyp wesentlich geringer.

2.2 Koexpression mit PSD95

Die Ergebnisse an NR1/NR2A-Rezeptoren in Abwesenheit von PSD95 stimmen erstaunlich gut mit denen bei Koexpression mit PSD95 überein. Entgegen der Ausgangshypothese scheint das Adapterprotein also keinen Einfluß auf die Kanalöffnung zu haben. In den hier beschriebenen Versuchen wurde nicht getestet, ob PSD95 in den gemessenen Zellen tatsächlich exprimiert wurde. Es wäre also auch denkbar, daß zu geringe oder fehlende Expression des Proteins für das unerwartete Ergebnis verantwortlich ist. Dagegen spricht aber zum einen, daß in der Arbeitsgruppe von Prof. Stephenson zur Koexpression dieselben Expressionsvektoren in den gleichen Mengenverhältnissen verwendet werden und die Expression von PSD95 dort eindeutig mittels Immunodetektion (*Western Blotting*) nachweisbar ist ([80],[81] und persönliche Bestätigung durch Prof. Stephenson). Zum

anderen zeigt sich in den Koexpressionsversuchen ein geringfügiger, aber signifikanter Effekt auf den EC_{50} der Glutamatbindung. Interessanterweise ergeben die Messungen an Rezeptoren mit deletiertem PSD95-Bindemotiv, die ursprünglich als Negativkontrollen zur PSD95-Koexpression gedacht waren, eine ähnliche Verschiebung des EC_{50} -Wertes und der Affinität für Glutamat. Diese Übereinstimmung läßt sich erklären, wenn man annimmt, daß das PSD95-Bindemotiv selbst die Pharmakologie des Rezeptors beeinflußt, sei es direkt durch intramolekulare Wechselwirkungen oder durch Bindung eines weiteren, unbekannten Effektorproteins. Die Bindung von PSD95 könnte dann zur Maskierung des Motivs und damit ebenso wie dessen Deletion zur Aufhebung seiner Wirkung führen. Allerdings ist diese Interpretation ohne weitere Untersuchungen spekulativ, da die Deletion des C-Terminus auch unspezifische Effekte zur Folge haben könnte, deren Auswirkung auf den EC_{50} unter Umständen nur zufällig der der PSD95-Koexpression entspricht. Tatsächlich verändert die Deletion anders als die Koexpression auch die Kanalöffnung geringfügig. Sowohl Öffnungs- als auch Schließrate sind um etwa 50% reduziert, was entsprechend eine etwas langsamere Aktivierungskinetik zur Folge hat. Da beide Ratenkonstanten etwa gleich stark betroffen sind, hat dies keinen Einfluß auf die Offenwahrscheinlichkeit.

Zusammenfassend läßt sich über die Ergebnisse an wt-Rezeptoren sagen, daß sie eine vernünftige Beschreibung der Rezeptoraktivierung liefern und wenigstens teilweise auch mit Ergebnissen anderer Arbeiten vergleichbar sind. Die Verlässlichkeit der Bestimmung der kinetischen Parameter wird durch die sehr gute Übereinstimmung der Ergebnisse mit und ohne Koexpression von PSD95 demonstriert.

3. Ergebnisse mit mutanten Rezeptoren

Von den hier untersuchten Mutationen in der Ligandenbindungsdomäne der NR2A-Untereinheit haben mehrere Auswirkungen auf Öffnen oder Schließen des Kanals. Damit bestätigen sie die Ausgangshypothese, daß Wechselwirkungen in der

Bindungsdomäne, und hier insbesondere solche zwischen der S1- und S2-Domäne, die Kanalöffnung steuern und für diese ratenlimitierend sind.

Auch wenn die Idee, daß die Kanalöffnung durch Konformationsänderungen in der Bindungsdomäne ligandengesteuerter Ionenkanäle eingeleitet wird, naheliegend scheint und im Fall von iGluRs durch Studien mit verschiedenen vollen und partiellen Agonisten gestützt wird (s. I.6), ist dies die erste Untersuchung, die Aussagen zum Beitrag einzelner Aminosäuren zu diesen Vorgängen erlaubt. Mit Lysin 459 und Asparagin 665 konnten zwei aller Wahrscheinlichkeit miteinander in Wechselwirkung tretende Reste der S1- und S2-Domäne identifiziert werden, die einen wichtigen Beitrag zur Kanalöffnung leisten. Zudem konnte ein solcher Beitrag für einen anderen, dem Strukturmodell nach in Frage kommenden Rest, Glutamat 387, ausgeschlossen werden.

Neben diesen recht eindeutigen Ergebnissen, bringt diese Arbeit aber auch eine Reihe weiterer Befunde, die durch die bisherigen Überlegungen nicht zufriedenstellend erklärt werden können. Die beiden wichtigsten unter diesen sind wohl die offensichtliche Auswirkung der Mutation H460A auf die Kanalöffnung sowie die Tatsache, daß unter den Kanalöffnungsmutationen deutlich mehr die Schließrate als die Öffnungsrate des Kanals betreffen. Um diese Beobachtungen zu verstehen, erweist sich eine energetische Betrachtungsweise der Daten als hilfreich. In Anhang

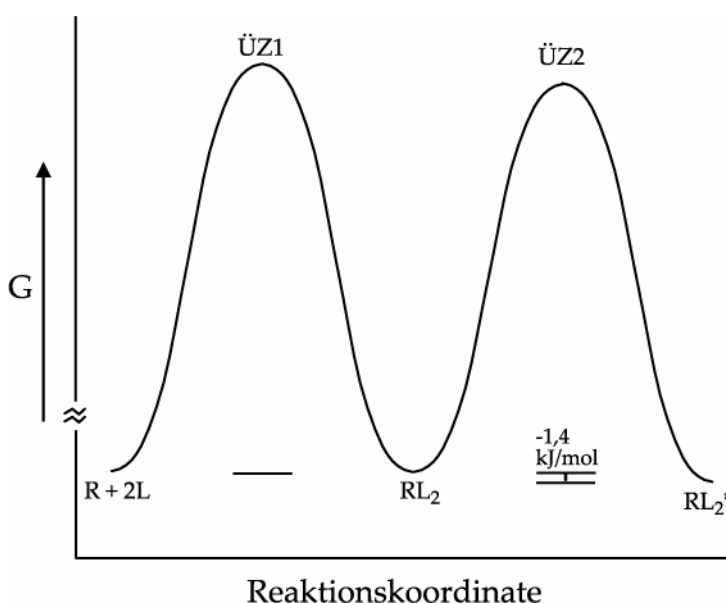


Abb. 33: Energiediagramm der Aktivierung eines NR2Awt-Rezeptors. Bei einer Glutamatkonzentration, die dem K_D ($3,4 \mu\text{M}$, s. III.2.1.1) des Rezeptors entspricht, ist die Ligandenbindung isoenergetisch, d.h. die Zustände $R + 2L$ und RL_2 haben die selbe freie Energie. Der offene Zustand RL_2^* ist geringfügig stabiler, da die Offenwahrscheinlichkeit $> 0,5$ ist. Die Lage der Übergangszustände ist nicht bekannt, was durch die unterbrochene y-Achse verdeutlicht werden soll.

D sind theoretische Überlegungen dargestellt, mit deren Hilfe aus den gemessenen Ratenkonstanten Energiediagramme der Rezeptoraktivierung konstruiert werden können. Ein solches Diagramm der Aktivierung eines wt-Rezeptors durch eine dem K_D entsprechende Glutamatkonzentration, das auf der Eyringschen Theorie des Übergangszustands [32] basiert, ist in Abbildung 33 gezeigt. Der Vergleich mit den Energiediagrammen der mutanten Rezeptoren ist weit besser als der Vergleich von Ratenkonstanten in der Lage, die Auswirkungen der Mutationen auf Ligandenbindung und Kanalaktivierung zu veranschaulichen.

Warum erhöht die Mutation H460A die Schließrate?

Dem Energiediagramm für die Mutation H460A (Abbildung 34) ist zu entnehmen, daß die Differenz der freien Energien zwischen offenem und geschlossenem Kanalzustand $0,9 \text{ kJ/mol}$ gegenüber $-1,4 \text{ kJ/mol}$ in wt-Rezeptoren beträgt. Die Mutation destabilisiert den offenen im Vergleich zum geschlossenen Zustand also um $2,3 \text{ kJ/mol}$. Dem steht eine Destabilisierung der Ligandenbindung um $18,5 \text{ kJ/mol}$ gegenüber, woran zu sehen ist, daß der Haupteffekt der Mutation eindeutig in der Affinitätsänderung besteht.

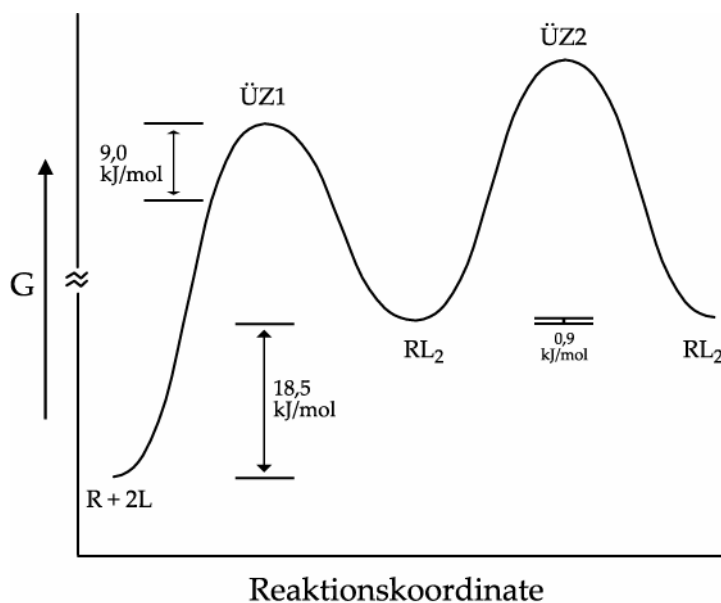


Abb. 34: Energiediagramm der Aktivierung von H460A-Rezeptoren. Die Mutation beeinflusst in erster Linie die Ligandenbindung. Bei Aktivierung mit $3,4 \mu\text{M}$ Glutamat beträgt die Energiedifferenz zwischen RL_2 und $R+2L$ $18,5 \text{ kJ/mol}$. Die Destabilisierung des Übergangszustands 1 um 9 kJ/mol verglichen mit wt-Rezeptoren ergibt sich aus der verringerten Bindungsrate der Mutante. Daneben wird aber auch der offene Zustand destabilisiert und ist dadurch um $0,9 \text{ kJ/mol}$ energiereicher als der geschlossene.

Andererseits ist der Effekt auf k_{cl} und p_o aber dem der K459E-Mutation vergleichbar, die hier vor allem unter dem Gesichtspunkt ihrer veränderten Kanalöffnungs-

eigenschaften diskutiert wird. Der Grund für die Auswirkung auf p_o könnte mit der Sonderstellung in Zusammenhang stehen, die H460A unter den untersuchten Mutationen einnimmt. Als einzige Mutation ist sie nämlich mit einer Änderung der sterischen Verhältnisse in der Bindungstasche selbst verbunden. Wie angesprochen scheint Histidin 460 eine nicht-polare Wechselwirkung mit dem Liganden einzugehen. Nimmt man lediglich an, daß diese Wechselwirkung durch die Mutation zum wesentlich kleineren Alanin verloren geht, ist kaum zu erklären, warum dies negative Auswirkungen auf die Kanalöffnung haben sollte. Eher wäre zu erwarten, daß die mit dem Schließen der Bindungsdomänen einhergehende Verengung der Bindungstasche eine Wechselwirkung zwischen Ligand und Alanin 460 ermöglicht, was die geschlossene Konformation der Bindungsdomänen und damit den offenen Kanalzustand stabilisieren sollte. Ebenfalls schwer zu verstehen ist, warum der Verlust einer nicht-polaren Wechselwirkung mit einer Änderung der freien Energie um mehr als 20 kJ/mol verbunden sein sollte.

Erklärt werden können die Beobachtungen jedoch auf andere Art. Durch die Mutation zu Alanin mit seiner deutlich kleineren Seitenkette entsteht eine Lücke in der Bindungstasche. Wenn diese durch ein Wassermolekül aufgefüllt wird, dann kommt es nach der Ligandenbindung zu einer Interaktion des polaren H₂O-Moleküls mit dem hydrophoben Rückgrat von L-Glutamat, was energetisch sehr ungünstig sein dürfte und die starke Verringerung der Affinität durch die Mutation erklären könnte. Die Verengung der Ligandenbindungsstelle beim Schließen der Bindungsdomänen, die in wt-Rezeptoren vermutlich zu einer Verstärkung der Wechselwirkung zwischen Histidin 460 und dem Liganden führt, würde in H460A-Rezeptoren das Wassermolekül und den Liganden in engere Nachbarschaft zwingen und damit die Energiebilanz weiter verschlechtern. Die Annahme eines Wassermoleküls in der mutierten Ligandenbindungsstelle macht also sowohl den großen energetischen Gesamteffekt der Mutation als auch die durch sie verursachte p_o -Änderung verständlich.

Warum wirken sich die meisten die Kanalaktivierung beeinflussenden Mutationen auf die Schließ- aber nicht auf die Öffnungsrate aus?

Von den fünf Mutationen, die die Kinetik der Kanalaktivierung beeinflussen, wirken sich vier (H460A, K459E, N665D und K459N) auf die Schließrate des Kanals aus. Dagegen hat nur die Mutation N665K signifikante Auswirkungen auf die Öffnungsrate (die Änderung für N665D bleibt knapp unter der Signifikanzgrenze). Bevor die Ursache hierfür diskutiert wird, soll zum einen nochmals die Lage der Mutationen im Strukturmodell der NR2A-Untereinheit vor allem in Bezug zum Liganden und der im folgenden wichtigen sechsten Helix der Bindungsdomäne in Erinnerung gerufen werden (Abbildung 35).

Außerdem soll kurz auf die in Anhang D dargestellte ϕ -Wertanalyse eingegangen

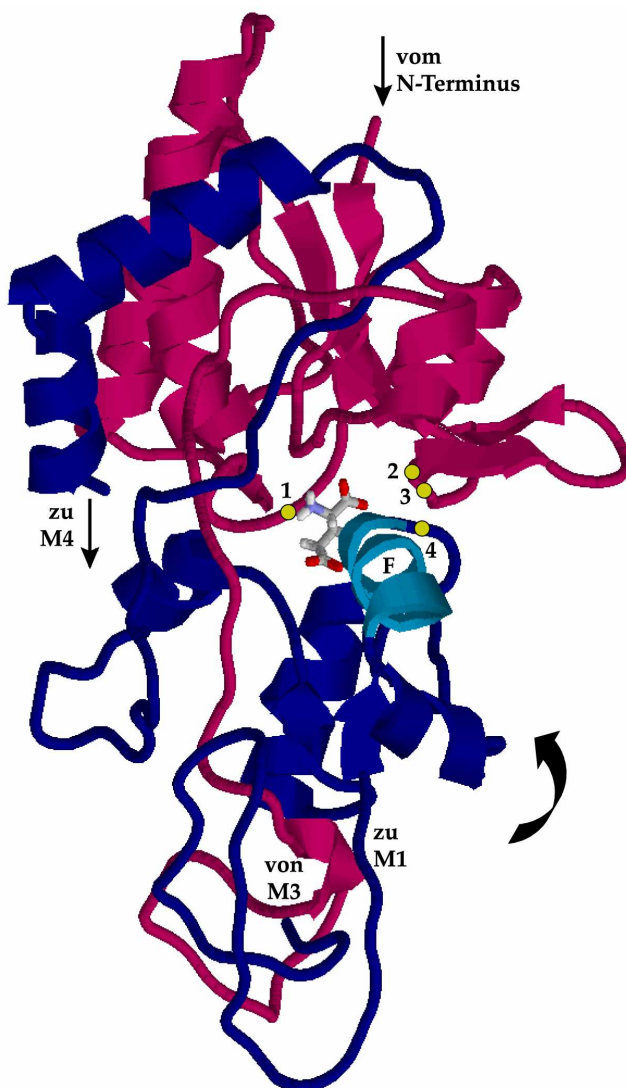


Abb. 35: Lage der untersuchten Mutationen im Strukturmodell der Bindungsdomäne der NR2A-Untereinheit. Die vier Positionen (gelbe Kreise), an denen Mutationen eingeführt wurden, liegen alle nahe der Ligandenbindungsstelle. Es sind: (1) E387, (2) H460, (3) K459 und (4) N665. Drei von ihnen sind Teil der S1-Domäne (rot), eine (665) befindet sich in der S2-Domäne (blau). Besonders hervorgehoben ist außerdem die sechste Helix der Bindungsdomäne (Helix F, hellblau). In dieser liegen mit Serin 667 und Threonin 668 zwei Reste, die an der Bindung der Carboxygruppen des Liganden Glutamat (als Stabmodell dargestellt) beteiligt sind (vgl. Abbildung 22). Die durch den Liganden induzierte Aufwärtsbewegung der S2-Domäne im Bereich um Helix F ist durch den Pfeil angedeutet. Das Modell selbst zeigt bereits den geschlossenen Zustand der Bindungsdomäne.

werden, die ein zentraler Bestandteil der weiteren Diskussion ist. Inwieweit Mutationen die Ratenkonstanten der Hin- bzw. Rückreaktion eines Prozesses beeinflussen, gibt, wie in Anhang D ausgeführt, Aufschluß über die Natur des Übergangszustands des Prozesses im Bereich der Mutation. Eine Veränderung der Rate der Hinreaktion, d.h. im Fall der Kanalaktivierung der Öffnungsrate, bedeutet, daß Ausgangs-, d.h. geschlossener, und Übergangszustand durch die untersuchte Mutation in unterschiedlicher Weise beeinflusst werden. Dies wiederum heißt, daß die Strukturen von Ausgangs- und Übergangszustand sich in der Umgebung der Mutation nicht völlig gleichen können. Analog weist eine Änderung der Rückreaktionsrate, hier k_{cl} , auf einen strukturellen Unterschied zwischen Übergangs- und Endzustand (offener Kanal) der Reaktion im Bereich der Mutation hin. Wie ebenfalls in Anhang D erläutert stellt die sogenannte ϕ -Wertanalyse eine Möglichkeit dar, die eben angestellten Überlegungen in quantitative Aussagen zu überführen. Der ϕ -Wert, der wie in Anhang D angegeben errechnet wird, beträgt 1 für Mutationen, die sich ausschließlich auf die Hinreaktion, also die Öffnungsrate, auswirken und 0 für solche, die nur die Rückreaktion, d.h. die Schließrate, beeinflussen.

Für die vier oben genannten Mutationen ergeben sich demnach ϕ -Werte nahe 0. Solche Werte sind dem eben Gesagten nach charakteristisch für Stellen eines Moleküls, an denen die lokale Struktur im Übergangszustand der betrachteten Reaktion noch der des Ausgangszustandes gleicht (Anhang D und [25]). Im vorliegenden Fall bedeutet dies, daß die Struktur des Rezeptors im Übergangszustand der Kanalaktivierung an den Positionen 459 und 460 noch der des geschlossenen Zustandes (RL_2) entsprechen muß. Einschränkend muß allerdings angemerkt werden, daß anhand nur einer Mutation pro Position bestimmte ϕ -Werte recht ungenau sein können. Eine verlässlichere Methode besteht in der Untersuchung mehrerer Mutationen an der selben Position und der Ermittlung des ϕ -Werts anhand einer der Brønsted-Gleichung analogen linearen Beziehung (Anhang D). Für den Rest 459 ist ein derartiges Vorgehen möglich, da hier zwei Mutationen (K459E und

K459N) untersucht wurden. Die gemeinsame Analyse beider Mutanten entsprechend Gleichung (7) aus Anhang D gibt einen ϕ -Wert von $-0,14 \pm 0,09$, ein Ergebnis, das die Werte der Einzelmutationen sowie der Mutation H460A bestätigt. Zusammen deuten diese Ergebnisse darauf hin, daß die Bindungsdomänen im Übergangszustand möglicherweise noch die offene Konformation einnehmen. Ein Schließen der Bindungsdomänen sollte nämlich gerade die Umgebung des Restes 459 stark verändern, weil er den Kristallstrukturen und Modellen nach erst dann in Wechselwirkung mit der S2-Domäne treten kann. Auch für Position 460 sollte dies gelten, da die durch das Schließen der Bindungsdomänen bewirkte Verengung der Bindungstasche die Wechselwirkung des Restes mit dem Liganden beeinflussen sollte.

Obwohl auf den ersten Blick überraschend, lassen sich die Ergebnisse jedoch mit bisher publizierten Vorstellungen zur Kanalöffnung vereinbaren. In einer kinetischen Arbeit basierend auf Messungen der intrinsischen Fluoreszenzänderung nach Ligandenzugabe an einem Konstrukt der Ligandenbindungsdomäne von GluR4 [1] wurde postuliert, daß bei der Ligandenbindung zunächst überwiegend Reste in der S1-Domäne, darunter Tyrosin 451, das zu Histidin 460 in NR2A homolog ist, Wechselwirkungen mit dem Liganden ausbilden (als *docking* bezeichnet), dann aber während der folgenden Konformationsänderungen (*locking*), die wahrscheinlich dem Schließen der Bindungsdomänen entsprechen, eine weitgehend passive Rolle spielen, während nun auch Reste in S2 in Kontakt mit dem Liganden treten und die Bindung verstärken. Bei diesen Resten handelt es sich um solche, die die Ammoniumgruppe des Liganden binden, also am Boden der Bindungstasche (am linken Rand in Abbildung 35) liegen. Für das in GluR4 konservierte Lysin 459 (dort Lys450) wird eine Stabilisierung der geschlossenen Konformation der Bindungstaschen diskutiert, ein Beitrag zum Schließen selbst jedoch als unwahrscheinlich angesehen.

Ausgehend von den Kristallstrukturen der Ligandenbindungsdomäne von GluR2 im Komplex mit verschiedenen effizienten Agonisten wird in [4] die Idee entwickelt, daß eine Bewegung von Helix F (s. Abbildung 35) in Richtung des Liganden den

entscheidenden Beitrag zur Kanalöffnung leistet. Diese Helix trägt in NR2A die Reste Serin 667 und Threonin 668, die an der Koordinierung der beiden Carboxygruppen von Glutamat beteiligt sind. Unterstützt wird die Bewegung der Helix durch ihr Dipolmoment, dessen positiver (N-terminaler) Pol auf die Carboxygruppen des Liganden weist.

Eine solche ligandeninduzierte Bewegung von Helix F als geschwindigkeitsbestimmendem Schritt der Kanalöffnung wäre in der Lage, die vorliegenden Daten zu erklären. Da Helix F selbst keine Kontakte zu S1, sondern nur zum Liganden eingeht, würde die Bindungstasche durch die Bewegung nicht komprimiert. Die Umgebung von Histidin 460 müßte sich nicht zwangsläufig ändern. Die Verzahnung der S1- und S2-Domänen über die Interaktionen Lys459-Asn665 und wohl auch Lys462-Glu669 würde den vorliegenden Daten nach erst im weiteren Verlauf der Aktivierung ausgebildet und würde dann, da Asparagin 665 am Ausgang von bzw. Glutamat 669 in Helix F sitzen, diese in ihrer neuen Position stabilisieren und so wie beobachtet die Schließrate des Kanals verringern. Dieses Modell, in dem sich die am Schließen der Bindungsdomäne beteiligten Wechselwirkungen sequentiell ausbilden, wird in Abbildung 36 veranschaulicht und mit dem zu Beginn der Arbeit angenommenen konzertierten Mechanismus verglichen.

Interessant wäre in diesem Zusammenhang natürlich die Untersuchung von Mutationen in Helix F. Für diese wären dann der eben beschriebenen Hypothese nach ϕ -Werte nahe 1 zu erwarten. Auch Mutationen von Asparagin 665, von denen zwei durchgeführt wurden, könnten hier prinzipiell interessant sein, weil sich dieser Rest noch in unmittelbarer Nähe von Helix F befindet, andererseits aber mit Lysin 459 eine Wechselwirkung über die Domänengrenze hinweg ausbildet. Die Daten zu den Mutationen N665D und N665K sind jedoch im Sinn der ϕ -Wert-Analyse nur sehr schwer interpretierbar. Während sich mit N665D ein ϕ -Wert für Position 665 von -0,51 ergibt, erhält man mit N665K einen Wert von 1,14. Einer Mutation zufolge gleicht also die Umgebung von Rest 665 noch vollständig dem geschlossenen Zustand (RL₂), der anderen nach vollständig dem offenen (RL₂*).

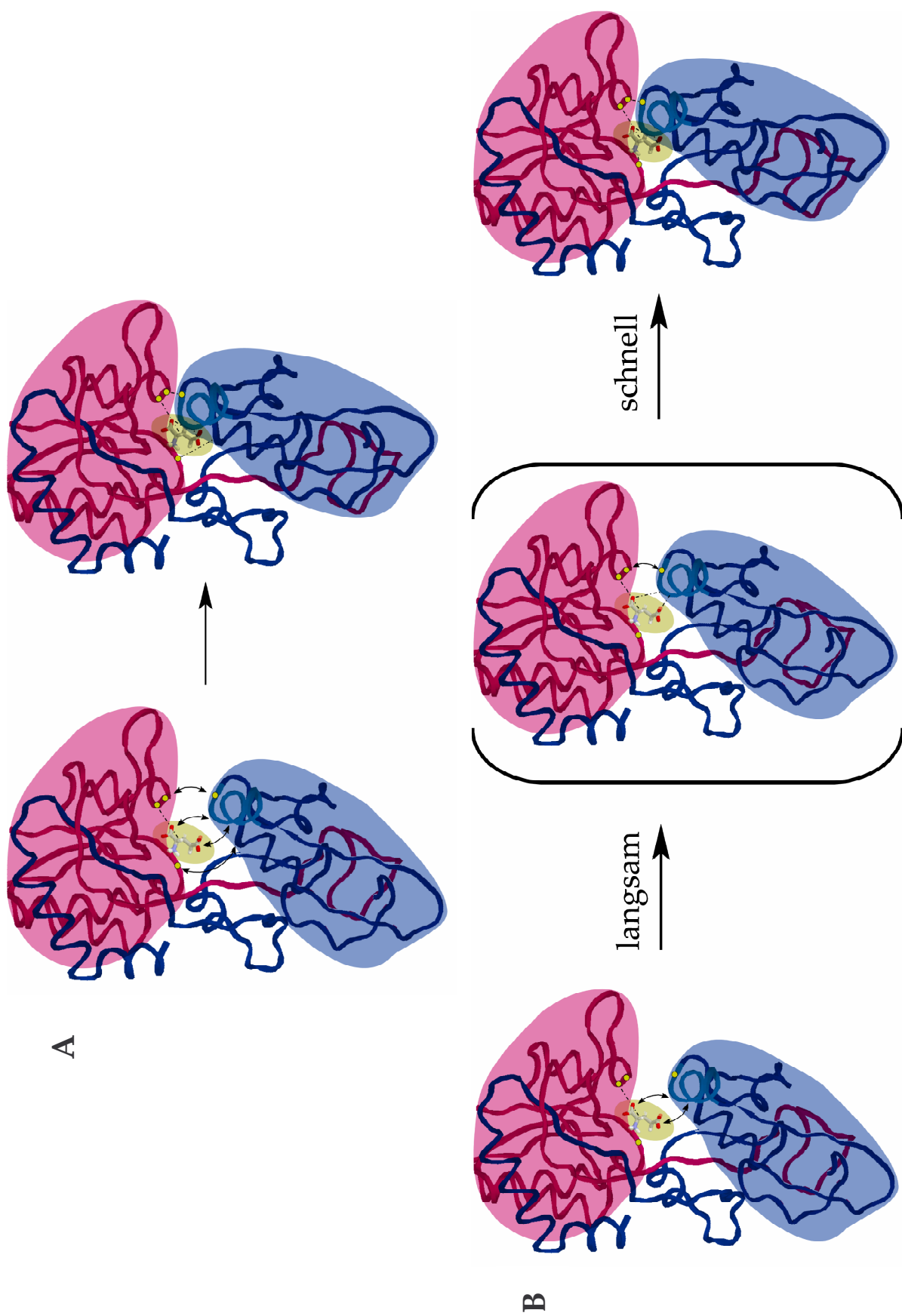


Abb. 36: Modellvorstellungen zur Kanalaktivierung von NMDA-Rezeptoren.

Die Orientierung der Strukturmodelle sowie die Kennzeichnung der Helix F und der Mutationen entsprechen der in Abbildung 35. Die gezeigte Bewegung der S2-Domäne beim Übergang der Bindungsdomäne von der offenen in die geschlossene Konformation ist schematisch zu verstehen und dient lediglich der Verdeutlichung des Vorgangs, berechnet wurde nur die Struktur der geschlossenen Bindungstasche.

A: Zu Beginn der Arbeit angenommener Ablauf des Schließens der Bindungsdomäne. Nach Bindung des Liganden vorwiegend durch Reste der S1-Domäne (rot, u.a. Histidin 460) führen Wechselwirkungen zwischen seiner Carboxygruppe und Helix F (hellblau) in der S2-Domäne (blau) im Zusammenspiel mit Interaktionen zwischen S1 und S2 in einem konzertierten Vorgang zur Annäherung der Teildomänen. Derartige intramolekulare Wechselwirkungen wurden zwischen Glutamat 387 und Helix H (unterhalb des Liganden, trägt Valin 691) sowie zwischen Lysin 459 und Asparagin 665 vermutet.

B: Die Ergebnisse der Arbeit präzisieren und korrigieren das Modell in (A) in mehreren Punkten. Sie bestätigen den wichtigen Beitrag von Histidin 460 zur Ligandenbindung (III.3.1) und die Beteiligung von Lysin 459 und Asparagin 665 an der Kanalaktivierung (III.3.3 und 4). Gleichzeitig zeigen sie aber, daß deren Wechselwirkung zwar für die Stabilisierung des offenen Kanalzustands (geschlossene Bindungsdomäne), nicht aber für die Geschwindigkeit der Kanalöffnung, also k_{op} , entscheidend ist. Diese muß durch einen vorher erfolgenden Schritt bestimmt werden, über den die Daten dieser Arbeit keine Aussage ermöglichen. Ausgehend vom ursprünglichen Modell (A) ist es jedoch als wahrscheinlich anzusehen, daß es sich bei diesem Schritt um die Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor über Helix F der S2-Domäne handelt. Darüber hinaus schließen die Daten eine Rolle einer eventuellen Wechselwirkung zwischen Glutamat 387 und Helix H bei der Kanalaktivierung aus. E387 ist dagegen, wohl indirekt, an der Ligandenbindung beteiligt (III.3.2). Unklar ist, ob der in Klammern gezeigte Zustand, in dem die Wechselwirkungen zwischen Ligand und Helix F bereits voll ausgebildet sind, während diejenige zwischen Lysin 459 und Asparagin 665 noch nicht besteht, einen Übergangszustand oder möglicherweise ein Intermediat der Kanalaktivierungsreaktion darstellt.

Ein solches Ergebnis kann nur erklärt werden, wenn man annimmt, daß die Mutation den Reaktionsweg der Kanalaktivierung verändert, daß also die Natur des Übergangszustandes vom Aminosäurerest an Position 665 beeinflusst wird. Prinzipiell ist ein derartiger Effekt für Mutationen wie N665K, die mit einem Ladungsaustausch verbunden sind, nicht unbedingt ungewöhnlich. Bemerkenswert ist aber möglicherweise, daß ein ähnliches Phänomen für einen Rest in der zweiten Transmembrandomäne der δ -Untereinheit des nikotinischen Acetylcholinrezeptors beschrieben wurde [25]. Für diese Transmembrandomäne konnte durch ϕ -Wert-Analyse ([25],[40]) gezeigt werden, daß die Umgebung ihrer N-terminalen, dem Zytoplasma zugewandten Hälfte im Übergangszustand der Kanalaktivierung noch

vollständig dem geschlossenen Zustand gleicht, während ihr C-terminaler Teil bereits teilweise dem offenen Zustand ähnelt. Die mit der Kanalaktivierung verbundene Konformationsänderung schreitet also von extra- nach intrazellulär entlang der Membrandomäne voran. Bei dem erwähnten Rest, dessen ϕ -Wert nicht klar bestimmt werden konnte, weil er mutationsabhängig stark schwankt, handelt es sich um die Position exakt in der Mitte der Helix. Ähnlich wie hier der Hypothese nach bei Position 665 handelt es sich dort also um einen Rest der am Übergang zweier Bereiche liegt, die Konformationsänderungen zu verschiedenen Zeitpunkten während des Aktivierungsprozesses durchlaufen. Denkbar wäre also, daß Rest 665 in Abhängigkeit von seiner Seitenkette mehr einem Bestandteil von Helix F oder einem Teil der S1-S2-Interaktionsfläche ähneln kann.

4. Bedeutung der Mutation N665D

Die Mutation N665D verdient auch insofern besondere Aufmerksamkeit als es sich bei ihr um die einzige Mutation handelt, die die Offenwahrscheinlichkeit signifikant erhöht. In diesem Sinn stellt sie also eine *gain of function*-Mutation dar, d.h. sie führt zu einer Überfunktion von NMDA-Rezeptoren. Aufgrund der interessanten Fragestellungen, die mit Hilfe einer solchen Mutation untersucht werden könnten (s.u.), scheint es angebracht, die Plausibilität der Ergebnisse besonders zu hinterfragen.

Energetisch betrachtet (Abbildung 37) stabilisiert die Mutation N665D den Daten nach den offenen Kanal um 4,4 kJ/mol verglichen mit wt-Rezeptoren. Daß dies ein realistischer Wert ist, wird anhand zweier Vergleiche deutlich. Die Stärke einer Wasserstoffbrückenbindung wird in wässriger Umgebung mit etwa 4 kJ/mol angesetzt. Für die Mutation K459E, die den Verlust einer Wasserstoffbrückenbindung pro NR2-Untereinheit zur Folge haben sollte, ergeben die Daten eine Destabilisierung des offenen Kanalzustandes um 9,8 kJ/mol relativ zum wt. Die geringere Stabilisierung in N665D paßt zur Vorstellung, daß hier lediglich die Stärke einer bereits bestehenden H-Brücke erhöht wird.

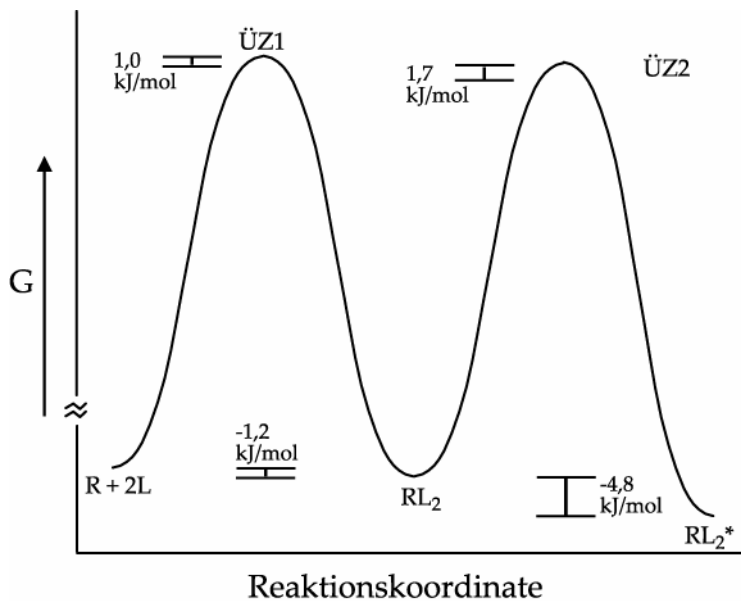


Abb. 37: Energetische Auswirkung der Mutation N665D. Die Mutation beeinflusst die Ligan-denbindung nur geringfügig. Die Lage der Übergangszustände im Vergleich zum wt ist ebenfalls nur leicht verändert. Der Haupteffekt der Mutation besteht hingegen in einer Stabilisierung des offenen Kanalzustandes RL_2^* .

Die eigentliche Bestätigung der kinetischen Ergebnisse stellen jedoch die Einzelkanaldaten dar, die zumindest für die Hälfte der Messungen eine deutlich erhöhte Offenwahrscheinlichkeit und verlängerte Offenzeiten erkennen lassen. Allerdings ist zur Zeit noch unklar, warum die andere Hälfte der Daten keine Veränderung gegenüber wt-Rezeptoren zeigt.

Mutante NMDA-Rezeptoren mit erhöhter Offenwahrscheinlichkeit wären für verschiedene Modellsysteme von Interesse. Überaktivierung von NMDA-Rezeptoren ist mitverantwortlich für die Schädigung und das Absterben von Neuronen unter ischemischen Bedingungen beispielsweise bei Schlaganfällen [60]. Tiermodelle, in denen die Empfindlichkeit von Neuronen gegenüber ischemischer Schädigung durch die Expression der mutanten Rezeptoren erhöht ist, könnten das Studium der zugrundeliegenden Prozesse und die Suche nach wirksamen Therapeutika erleichtern.

Eine Anwendungsmöglichkeit der Mutation ergäbe sich auch für die Untersuchung von Lernvorgängen. Prinzipiell sollte die Expression der mutanten Rezeptoren im Tiermodell zu gesteigerter Lernfähigkeit und erhöhter Gedächtnisleistung führen, wie dies im Fall einer Überexpression der NR1-Untereinheit bereits gezeigt werden konnte [91]. Schließlich wird die Unterfunktion bzw. mangelnde Expression von NMDA-Rezeptoren mit erhöhter Anfälligkeit für Schizophrenie in Verbindung

gebracht (Übersicht in [23]). Hier wäre es hochinteressant zu sehen, ob bzw. inwieweit im Tiermodell durch die Mutation ein Schutz gegen schizophrenieartige Symptome erreicht werden kann.

Vor der Nutzung von NMDA-Rezeptoren mit der N665D-Mutation in derartigen Versuchen sind allerdings umfangreiche Tests erforderlich. Zum einen sollten die Auswirkungen der Mutation in heterologen Expressionssystemen weiter untersucht werden. Wichtig wäre hier eine ausführliche Charakterisierung der mutanten Rezeptoren bezüglich wichtiger pharmakologischer Eigenschaften, z. B. der Glyzin-abhängigkeit, des Mg^{2+} -Blocks und des Desensitisierungsverhaltens, aber auch eine genauere Untersuchung auf Einzelkanalebene. Daneben müßte das Verhalten mutanter Rezeptoren bei neuronaler Expression geprüft werden, da es denkbar wäre, daß hier zelluläre Regulationsmechanismen die Offenwahrscheinlichkeit modulieren und im ungünstigsten Fall der von wt-Rezeptoren angleichen. Als letzter Schritt müßte dann nachgewiesen werden, daß die Expression der Rezeptoren im Tiermodell tatsächlich zu einer Verstärkung der durch NMDA-Rezeptoren vermittelten Signaltransduktion führt. Durch Autoregulationsmechanismen des ZNS könnte es auch hier zu einer Abschwächung oder sogar einer Auslöschung des Mutationseffekts kommen. Die potentiellen Anwendungsmöglichkeiten der Mutation lassen den mit den nötigen Voruntersuchungen verbundenen Aufwand jedoch gerechtfertigt erscheinen.

5. Abschließende Bewertung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine zuverlässige Methode zur Quantifizierung der kinetischen Auswirkungen von Mutationen in NMDA-Rezeptoren, und prinzipiell auch anderen ligandengesteuerten Ionenkanälen, etabliert werden. Mit dem Nachweis, daß es möglich ist, durch Mutationen in der Bindungsdomäne die Offenwahrscheinlichkeit des Ionenkanals zu beeinflussen, konnte anschließend das wesentliche Ziel der Arbeit erreicht werden. Die Lage dieser Mutationen im Strukturmodell läßt darauf schließen, daß sie eine Rolle bei der Wechselwirkung

zwischen S1- und S2-Domäne spielen und damit am Schließen der Bindungsdomäne beteiligt sind. Damit stützen die Ergebnisse einen ursächlichen Zusammenhang zwischen dem Schließen der Bindungsdomäne und dem Öffnen des Ionenkanals. Gleichzeitig deuten sie aber darauf hin, daß die für die Kanalöffnung ratenlimitierende Konformationsänderung zu einem noch früheren Zeitpunkt des Aktivierungsprozesses erfolgen muß. Eine Hypothese ist, daß es sich bei diesem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt um eine Bewegung von Helix F in S2 in Richtung der Ligandenbindungsstelle handeln könnte. Um dies zu bestätigen, wäre allerdings die Untersuchung einer Reihe von Mutanten in diesem Bereich notwendig.

V. Zusammenfassung

N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren sind als ionotrope Glutamatrezeptoren (iGluRs) an der Signalübertragung durch den wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter im zentralen Nervensystem, L-Glutamat, beteiligt. Innerhalb der Familie der iGluRs kommt ihnen insofern eine Sonderstellung zu, als durch sie mehrere Formen neuronaler Plastizität, welche wiederum als Grundlage von Lernvorgängen im Nervensystem gilt, vermittelt werden. Vor allem aufgrund ihrer Bedeutung für eine derart fundamentale Leistung des Nervensystems sind NMDA-Rezeptoren außerordentlich gründlich untersucht worden. Dennoch sind auch heute noch zentrale Fragen zu ihrer Funktionsweise nicht hinreichend geklärt, darunter auch diejenige, wie auf molekularer Ebene die Umsetzung der Glutamatbindung in die Öffnung des Ionenkanals erfolgt. Publiizierte Kristallstrukturen der Ligandenbindungsdomäne eines, mit NMDA-Rezeptoren nahe verwandten, AMPA-Rezeptors (GluR2) und auf diesen basierende Strukturmodelle der Glutamatbindungsdomänen der NR2-Untereinheiten von NMDA-Rezeptoren haben die Grundlage für ein Modell der ligandeninduzierten und der Kanalöffnung vorausgehenden Vorgänge in der Bindungsdomäne geschaffen. Diesem zufolge schließt sich die aus den Teildomänen S1 und S2 bestehende Bindungsdomäne venusfliegenfallenartig um den Liganden und die durch die Bewegung vor allem der S2-Domäne entstehende mechanische Spannung führt zur Öffnung des Ionenkanals.

Dieses Modell wurde in der vorliegenden Arbeit überprüft und präzisiert. Hierzu wurden an verschiedenen Positionen in der Ligandenbindungsdomäne punktmutierte NR1/NR2A-Rezeptoren heterolog in Säugerzellen exprimiert und durch Glutamat hervorgerufene Gesamtzellströme elektrophysiologisch gemessen, um mittels anschließender kinetischer Auswertung und Vergleich mit Daten von Wildtyprezeptoren Aminosäurereste in der Bindungsdomäne zu identifizieren, die einen Beitrag zur Kanalöffnung leisten. Die für detaillierte kinetische Analysen notwendige Schnelligkeit der Zugabe des Liganden wurde dabei durch dessen

photochemische Freisetzung aus einer maskierten und dadurch inaktiven Vorstufe (*caged compound*) erreicht.

Die Ergebnisse bestätigen das Modell der Kopplung der Kanalöffnung an das Schließen der Bindungsdomäne, da Reste, die dem Strukturmodell nach die Bindungsdomäne in der geschlossenen Konformation stabilisieren, den Daten zufolge auch wichtig für die Kanalaktivierung sind. Darüber hinaus erweitern sie das Verständnis der genauen zeitlichen Abfolge der ligandeninduzierten Konformationsänderungen in der Bindungsdomäne. Intramolekulare Wechselwirkungen zwischen den Teildomänen S1 und S2 spielen demnach erst relativ spät im Aktivierungsprozeß eine Rolle und dienen vor allem der Stabilisierung des geschlossenen Zustandes der Bindungsdomäne und damit des offenen Ionenkanals. Mit NR2A(N665D) konnte eine Mutation identifiziert werden, die den offenen Zustand des Kanals stark stabilisiert und damit seine Offenwahrscheinlichkeit deutlich erhöht. Diese Mutation könnte für die Untersuchung verschiedener Fragestellungen zur physiologischen und pathophysiologischen Funktion von NMDA-Rezeptoren von Interesse sein, muß allerdings zuvor noch eingehender kinetisch und pharmakologisch charakterisiert werden.

VI. Literaturverzeichnis

- (1) Abele, R., Keinänen, K., Madden, D. R.: **Agonist-induced isomerization in a glutamate receptor ligand-binding domain. A kinetic and mutagenetic analysis.** J. Biol. Chem., 2000. 275(28): 21355-63.
- (2) Adams, S. R., Tsien, R. Y.: **Controlling cell chemistry with caged compounds.** Annu. Rev. Physiol., 1993. 55: 755-84.
- (3) Anson, L. C., Schoepfer, R., Colquhoun, D., Wyllie, D. J.: **Single-channel analysis of an NMDA receptor possessing a mutation in the region of the glutamate binding site.** J Physiol, 2000. 527 Pt 2: 225-37.
- (4) Armstrong, N., Gouaux, E.: **Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core.** Neuron, 2000. 28(1): 165-81.
- (5) Armstrong, N., Mayer, M., Gouaux, E.: **Tuning activation of the AMPA-sensitive GluR2 ion channel by genetic adjustment of agonist-induced conformational changes.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2003. 100(10): 5736-41.
- (6) Armstrong, N., Sun, Y., Chen, G. Q., Gouaux, E.: **Structure of a glutamate-receptor ligand-binding core in complex with kainate.** Nature, 1998. 395(6705): 913-7.
- (7) Ayalon, G., Stern-Bach, Y.: **Functional assembly of AMPA and kainate receptors is mediated by several discrete protein-protein interactions.** Neuron, 2001. 31(1): 103-13.
- (8) Banke, T. G., Traynelis, S. F.: **Activation of NR1/NR2B NMDA receptors.** Nat. Neurosci., 2003. 6(2): 144-52.
- (9) Bon, C. L., Garthwaite, J.: **On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation.** J. Neurosci., 2003. 23(5): 1941-8.
- (10) Brønsted, J. N., Pedersen, K.: **The catalytic decomposition of nitramide and its physico-chemical applications.** Z. Phys. Chem., 1924. A108: 185-235.
- (11) Canepari, M., Nelson, L., Papageorgiou, G., Corrie, J. E., Ogden, D.: **Photochemical and pharmacological evaluation of 7-nitroindoliny- and 4-methoxy-7-nitroindoliny-amino acids as novel, fast caged neurotransmitters.** J. Neurosci. Methods, 2001. 112(1): 29-42.
- (12) Careaga, C. L., Sutherland, J., Sabeti, J., Falke, J. J.: **Large amplitude twisting motions of an interdomain hinge: a disulfide trapping study of the galactose-glucose binding protein.** Biochemistry (Mosc). 1995. 34(9): 3048-55.

- (13) Casado, M., Isope, P., Ascher, P.: **Involvement of presynaptic N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar long-term depression.** *Neuron*, 2002. 33(1): 123-30.
- (14) Chatterton, J. E., Awobuluyi, M., Premkumar, L. S., Takahashi, H., Talantova, M., Shin, Y., Cui, J., Tu, S., Sevarino, K. A., Nakanishi, N., Tong, G., Lipton, S. A., Zhang, D.: **Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits.** *Nature*, 2002. 415(6873): 793-8.
- (15) Chen, G. Q., Cui, C., Mayer, M. L., Gouaux, E.: **Functional characterization of a potassium-selective prokaryotic glutamate receptor.** *Nature*, 1999. 402(6763): 817-21.
- (16) Chen, L., Chetkovich, D. M., Petralia, R. S., Sweeney, N. T., Kawasaki, Y., Wenthold, R. J., Brecht, D. S., Nicoll, R. A.: **Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms.** *Nature*, 2000. 408(6815): 936-43.
- (17) Chen, N., Luo, T., Raymond, L. A.: **Subtype-dependence of NMDA receptor channel open probability.** *J. Neurosci.*, 1999. 19(16): 6844-54.
- (18) Christopherson, K. S., Hillier, B. J., Lim, W. A., Brecht, D. S.: **PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain.** *J. Biol. Chem.*, 1999. 274(39): 27467-73.
- (19) Clements, J. D., Feltz, A., Sahara, Y., Westbrook, G. L.: **Activation kinetics of AMPA receptor channels reveal the number of functional agonist binding sites.** *J. Neurosci.*, 1998. 18(1): 119-27.
- (20) Clements, J. D., Westbrook, G. L.: **Activation kinetics reveal the number of glutamate and glycine binding sites on the N-methyl-D-aspartate receptor.** *Neuron*, 1991. 7(4): 605-13.
- (21) Colquhoun, D.: **Binding, gating, affinity and efficacy: the interpretation of structure-activity relationships for agonists and of the effects of mutating receptors.** *Br. J. Pharmacol.*, 1998. 125(5): 924-47.
- (22) Colquhoun, D., Sigworth, F. J.: **Fitting and statistical analysis of single-channel records.** in *Single-channel recording*. Sakmann, B., Neher, E., 2. Auflage, 1995. Seite 483-587. Plenum Press, New York.
- (23) Coyle, J. T., Tsai, G., Goff, D.: **Converging evidence of NMDA receptor hypofunction in the pathophysiology of schizophrenia.** *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2003. 1003: 318-27.
- (24) Curras, M. C., Pallotta, B. S.: **Single-channel evidence for glycine and NMDA requirement in NMDA receptor activation.** *Brain Res.*, 1996. 740(1-2): 27-40.

- (25) Cymes, G. D., Grosman, C., Auerbach, A.: **Structure of the transition state of gating in the acetylcholine receptor channel pore: a phi-value analysis.** *Biochemistry (Mosc)*. 2002. 41(17): 5548-55.
- (26) Diamond, J. S., Jahr, C. E.: **Transporters buffer synaptically released glutamate on a submillisecond time scale.** *J. Neurosci.*, 1997. 17(12): 4672-87.
- (27) Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., Traynelis, S. F.: **The glutamate receptor ion channels.** *Pharmacol. Rev.*, 1999. 51(1): 7-61.
- (28) Dodt, H. U., Frick, A., Kampe, K., Zieglgansberger, W.: **NMDA and AMPA receptors on neocortical neurons are differentially distributed.** *Eur. J. Neurosci.*, 1998. 10(11): 3351-7.
- (29) Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., MacKinnon, R.: **The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity.** *Science*, 1998. 280(5360): 69-77.
- (30) Edmonds, B., Gibb, A. J., Colquhoun, D.: **Mechanisms of activation of glutamate receptors and the time course of excitatory synaptic currents.** *Annu. Rev. Physiol.*, 1995. 57: 495-519.
- (31) Erreger, K., Wyllie, D. J., Banke, T., Lee, C. J., Traynelis, S. F.: **Activation of NR1NR2A and NR1NR2B NMDA receptors.** Society for Neuroscience, 33rd Annual Meeting, 2003. Posterbeitrag.
- (32) Eyring, H.: **The activated complex and the absolute rate of chemical reactions.** *J. Chem. Phys.*, 1935. 3: 107.
- (33) Ferrer-Montiel, A. V., Montal, M.: **Pentameric subunit stoichiometry of a neuronal glutamate receptor.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1996. 93(7): 2741-4.
- (34) Fersht, A.: **Structure and mechanism in protein science.** 1998. Freeman, W. H., New York.
- (35) Furukawa, H., Gouaux, E.: **Mechanisms of activation, inhibition and specificity: crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core.** *EMBO J.*, 2003. 22(12): 2873-85.
- (36) Gee, K. R., Niu, L., Schaper, K., Hess, G. P.: **Caged bioactive carboxylates. Synthesis, photolysis studies, and biological characterization of a new caged N-methyl-D-aspartic acid.** *J. Org. Chem.*, 1995. 60(13): 4260-3.
- (37) Gibb, A. J., Colquhoun, D.: **Activation of N-methyl-D-aspartate receptors by L-glutamate in cells dissociated from adult rat hippocampus.** *J Physiol*, 1992. 456: 143-79.

- (38) Gorman, C. M., Gies, D., McCray, G.: **Transient production of proteins using adenovirus transformed cell line.** DNA Protein Engineering Techniques, 1990. 2: 3-10.
- (39) Grewer, C.: **Investigation of the alpha(1)-glycine receptor channel-opening kinetics in the submillisecond time domain.** Biophys. J., 1999. 77(2): 727-38.
- (40) Grosman, C., Zhou, M., Auerbach, A.: **Mapping the conformational wave of acetylcholine receptor channel gating.** Nature, 2000. 403(6771): 773-6.
- (41) Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F. J.: **Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches.** Pflugers Arch., 1981. 391(2): 85-100.
- (42) Huettner, J. E., Bean, B. P.: **Block of N-methyl-D-aspartate-activated current by the anticonvulsant MK-801: selective binding to open channels.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1988. 85(4): 1307-11.
- (43) Ivanovic, A., Reilander, H., Laube, B., Kuhse, J.: **Expression and initial characterization of a soluble glycine binding domain of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit.** J. Biol. Chem., 1998. 273(32): 19933-7.
- (44) Jayaraman, V., Hess, G. P.: **Transient kinetic investigations of the gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor.** Forty-second Annual Meeting of the Biophysical Society, 1998. Kansas City, MO.
- (45) Jin, R., Banke, T. G., Mayer, M. L., Traynelis, S. F., Gouaux, E.: **Structural basis for partial agonist action at ionotropic glutamate receptors.** Nat. Neurosci., 2003. 6(8): 803-10.
- (46) Jin, R., Gouaux, E.: **Probing the function, conformational plasticity, and dimer-dimer contacts of the GluR2 ligand-binding core: studies of 5-substituted willardiines and GluR2 S1S2 in the crystal.** Biochemistry (Mosc). 2003. 42(18): 5201-13.
- (47) Johnson, J. W., Ascher, P.: **Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons.** Nature, 1987. 325(6104): 529-31.
- (48) Kim, E., Niethammer, M., Rothschild, A., Jan, Y. N., Sheng, M.: **Clustering of Shaker-type K⁺ channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases.** Nature, 1995. 378(6552): 85-8.
- (49) Kim, E., Sheng, M.: **PDZ domain proteins of synapses.** Nat Rev Neurosci, 2004. 5(10): 771-81.

- (50) Kornau, H. C., Schenker, L. T., Kennedy, M. B., Seeburg, P. H.: **Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95.** *Science*, 1995. 269(5231): 1737-40.
- (51) Kuner, T., Seeburg, P. H., Guy, H. R.: **A common architecture for K⁺ channels and ionotropic glutamate receptors?** *Trends Neurosci.*, 2003. 26(1): 27-32.
- (52) Kuryatov, A., Laube, B., Betz, H., Kuhse, J.: **Mutational analysis of the glycine-binding site of the NMDA receptor: structural similarity with bacterial amino acid-binding proteins.** *Neuron*, 1994. 12(6): 1291-300.
- (53) Laube, B., Hirai, H., Sturgess, M., Betz, H., Kuhse, J.: **Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit.** *Neuron*, 1997. 18(3): 493-503.
- (54) Laube, B., Kuhse, J., Betz, H.: **Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors.** *J. Neurosci.*, 1998. 18(8): 2954-61.
- (55) Laube, B., Schemm, R., Betz, H.: **Molecular determinants of ligand discrimination in the glutamate-binding pocket of the NMDA receptor.** *Neuropharmacology*, 2004. im Druck.
- (56) Lester, R. A., Tong, G., Jahr, C. E.: **Interactions between the glycine and glutamate binding sites of the NMDA receptor.** *J. Neurosci.*, 1993. 13(3): 1088-96.
- (57) Li, G., Niu, L.: **How fast does the GluR1Qflip AMPA receptor channel open?** *J. Biol. Chem.*, 2003. 10: 10.
- (58) Li, G., Oswald, R. E., Niu, L.: **Channel-opening kinetics of GluR6 kainate receptor.** *Biochemistry (Mosc)*. 2003. 42(42): 12367-75.
- (59) Li, G., Pei, W., Niu, L.: **Channel-opening kinetics of GluR2Q(flip) AMPA receptor: a laser-pulse photolysis study.** *Biochemistry (Mosc)*. 2003. 42(42): 12358-66.
- (60) Lipton, S. A.: **Prospects for clinically tolerated NMDA antagonists: open-channel blockers and alternative redox states of nitric oxide.** *Trends Neurosci.*, 1993. 16(12): 527-32.
- (61) Mano, I., Teichberg, V. I.: **A tetrameric subunit stoichiometry for a glutamate receptor-channel complex.** *Neuroreport*, 1998. 9(2): 327-31.
- (62) Martone, M. E., Jones, Y. Z., Young, S. J., Ellisman, M. H., Zivin, J. A., Hu, B. R.: **Modification of postsynaptic densities after transient cerebral ischemia: a quantitative and three-dimensional ultrastructural study.** *J. Neurosci.*, 1999. 19(6): 1988-97.

- (63) Matsubara, N., Hess, G. P.: **On the mechanism of a mammalian neuronal type nicotinic acetylcholine receptor investigated by a rapid chemical kinetic technique. Detection and characterization of a short-lived, previously unobserved, main receptor form in PC12 cells.** *Biochemistry (Mosc)*. 1992. 31(24): 5477-87.
- (64) Mayer, M. L., Armstrong, N.: **Structure and function of glutamate receptor ion channels.** *Annu. Rev. Physiol.*, 2004. 66: 161-81.
- (65) Mayer, M. L., Westbrook, G. L.: **Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones.** *J Physiol*, 1987. 394: 501-27.
- (66) Mayer, M. L., Westbrook, G. L., Guthrie, P. B.: **Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones.** *Nature*, 1984. 309(5965): 261-3.
- (67) Morrison, J., Wan, P., Corrie, J. E., Papageorgiou, G.: **Mechanisms of photorelease of carboxylic acids from 1-acyl-7-nitroindolines in solutions of varying water content.** *Photochem Photobiol Sci*, 2002. 1(12): 960-9.
- (68) Nagel, G., Fendler, K., Grell, E., Bamberg, E.: **Na⁺ currents generated by the purified (Na⁺ + K⁺)-ATPase on planar lipid membranes.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1987. 901(2): 239-49.
- (69) Nehring, R. B., Wischmeyer, E., Doring, F., Veh, R. W., Sheng, M., Karschin, A.: **Neuronal inwardly rectifying K(+) channels differentially couple to PDZ proteins of the PSD-95/SAP90 family.** *J. Neurosci.*, 2000. 20(1): 156-62.
- (70) Nishi, M., Hinds, H., Lu, H. P., Kawata, M., Hayashi, Y.: **Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner.** *J. Neurosci.*, 2001. 21(23): RC185.
- (71) Oh, B. H., Pandit, J., Kang, C. H., Nikaido, K., Gokcen, S., Ames, G. F., Kim, S. H.: **Three-dimensional structures of the periplasmic lysine/arginine/ornithine-binding protein with and without a ligand.** *J. Biol. Chem.*, 1993. 268(15): 11348-55.
- (72) Panchenko, V. A., Glasser, C. R., Mayer, M. L.: **Structural similarities between glutamate receptor channels and K(+) channels examined by scanning mutagenesis.** *J. Gen. Physiol.*, 2001. 117(4): 345-60.
- (73) Papageorgiou, G., Corrie, J. E.: **Effects of aromatic substituents on the photocleavage of 1-acyl-7-nitroindolines.** *Tetrahedron*, 2000. 56(41): 8197-205.

- (74) Papageorgiou, G., Ogden, D., Barth, A., Corrie, J. E.: **Photorelease of carboxylic acids from 1-acyl-7-nitroindolines in aqueous solution: rapid and efficient photorelease of L-glutamate.** J. Am. Chem. Soc., 1999. 121(27): 6503-4.
- (75) Popescu, G., Auerbach, A.: **Modal gating of NMDA receptors and the shape of their synaptic response.** Nat. Neurosci., 2003. 6(5): 476-83.
- (76) Premkumar, L. S., Auerbach, A.: **Stoichiometry of recombinant N-methyl-D-aspartate receptor channels inferred from single-channel current patterns.** J. Gen. Physiol., 1997. 110(5): 485-502.
- (77) Regalado, M. P., Villarroel, A., Lerma, J.: **Intersubunit cooperativity in the NMDA receptor.** Neuron, 2001. 32(6): 1085-96.
- (78) Roche, K. W., Standley, S., McCallum, J., Dune Ly, C., Ehlers, M. D., Wenthold, R. J.: **Molecular determinants of NMDA receptor internalization.** Nat. Neurosci., 2001. 4(8): 794-802.
- (79) Rosenmund, C., Stern-Bach, Y., Stevens, C. F.: **The tetrameric structure of a glutamate receptor channel.** Science, 1998. 280(5369): 1596-9.
- (80) Rutter, A. R., Freeman, F. M., Stephenson, F. A.: **Further characterization of the molecular interaction between PSD-95 and NMDA receptors: the effect of the NR1 splice variant and evidence for modulation of channel gating.** J. Neurochem., 2002. 81(6): 1298-307.
- (81) Rutter, A. R., Stephenson, F. A.: **Coexpression of postsynaptic density-95 protein with NMDA receptors results in enhanced receptor expression together with a decreased sensitivity to L-glutamate.** J. Neurochem., 2000. 75(6): 2501-10.
- (82) Safferling, M., Tichelaar, W., Kummerle, G., Jouppila, A., Kuusinen, A., Keinänen, K., Madden, D. R.: **First images of a glutamate receptor ion channel: oligomeric state and molecular dimensions of GluRB homomers.** Biochemistry (Mosc). 2001. 40(46): 13948-53.
- (83) Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R.: **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1977. 74(12): 5463-7.
- (84) Schorge, S., Colquhoun, D.: **Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with truncated and tandem subunits.** J. Neurosci., 2003. 23(4): 1151-8.
- (85) Steigerwald, F., Schulz, T. W., Schenker, L. T., Kennedy, M. B., Seeburg, P. H., Kohr, G.: **C-Terminal truncation of NR2A subunits impairs synaptic but not extrasynaptic localization of NMDA receptors.** J. Neurosci., 2000. 20(12): 4573-81.

- (86) Stern, P., Behe, P., Schoepfer, R., Colquhoun, D.: **Single-channel conductances of NMDA receptors expressed from cloned cDNAs: comparison with native receptors.** *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 1992. 250(1329): 271-7.
- (87) Stern, P., Cik, M., Colquhoun, D., Stephenson, F. A.: **Single channel properties of cloned NMDA receptors in a human cell line: comparison with results from *Xenopus* oocytes.** *J Physiol*, 1994. 476(3): 391-7.
- (88) Stern-Bach, Y., Bettler, B., Hartley, M., Sheppard, P. O., O'Hara, P. J., Heinemann, S. F.: **Agonist selectivity of glutamate receptors is specified by two domains structurally related to bacterial amino acid-binding proteins.** *Neuron*, 1994. 13(6): 1345-57.
- (89) Sucher, N. J., Akbarian, S., Chi, C. L., Leclerc, C. L., Awobuluyi, M., Deitcher, D. L., Wu, M. K., Yuan, J. P., Jones, E. G., Lipton, S. A.: **Developmental and regional expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDAR-L) in the rodent brain.** *J. Neurosci.*, 1995. 15(10): 6509-20.
- (90) Sun, Y., Olson, R., Horning, M., Armstrong, N., Mayer, M., Gouaux, E.: **Mechanism of glutamate receptor desensitization.** *Nature*, 2002. 417(6886): 245-53.
- (91) Tang, Y. P., Shimizu, E., Dube, G. R., Rampon, C., Kerchner, G. A., Zhuo, M., Liu, G., Tsien, J. Z.: **Genetic enhancement of learning and memory in mice.** *Nature*, 1999. 401(6748): 63-9.
- (92) Taverna, S., Pennartz, C. M.: **Postsynaptic modulation of AMPA- and NMDA-receptor currents by Group III metabotropic glutamate receptors in rat nucleus accumbens.** *Brain Res.*, 2003. 976(1): 60-8.
- (93) Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. G.: **The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools.** *Nucleic Acids Res*, 1997. 25(24): 4876-82.
- (94) Thomson, A. M., Walker, V. E., Flynn, D. M.: **Glycine enhances NMDA-receptor mediated synaptic potentials in neocortical slices.** *Nature*, 1989. 338(6214): 422-4.
- (95) Udgaonkar, J. B., Hess, G. P.: **Chemical kinetic measurements of a mammalian acetylcholine receptor by a fast-reaction technique.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1987. 84(24): 8758-62.
- (96) Wieboldt, R., Gee, K. R., Niu, L., Ramesh, D., Carpenter, B. K., Hess, G. P.: **Photolabile precursors of glutamate: synthesis, photochemical properties, and**

- activation of glutamate receptors on a microsecond time scale.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1994. 91(19): 8752-6.
- (97) Wittekindt, B., Malany, S., Schemm, R., Otvos, L., Maccacchini, M. L., Laube, B., Betz, H.: **Point mutations identify the glutamate binding pocket of the N-methyl-D-aspartate receptor as major site of conantokin-G inhibition.** Neuropharmacology, 2001. 41(6): 753-61.
- (98) Wyllie, D. J., Behe, P., Colquhoun, D.: **Single-channel activations and concentration jumps: comparison of recombinant NR1a/NR2A and NR1a/NR2D NMDA receptors.** J Physiol, 1998. 510 (Pt 1): 1-18.
- (99) Yamada, Y., Chochi, Y., Takamiya, K., Sobue, K., Inui, M.: **Modulation of the channel activity of the epsilon2/zeta1-subtype N-methyl D-aspartate receptor by PSD-95.** J. Biol. Chem., 1999. 274(10): 6647-52.

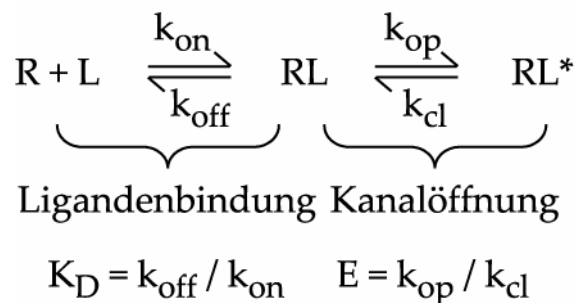
Anhänge

A Verzeichnis der Abkürzungen

AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat
CNB-	α -Carboxy-2-nitrobenzyl-
h	Stunde
iGluR	ionotroper Glutamatrezeptor
min	Minute
MNI-	4-Methoxy-7-nitroindolinylnyl-
NI-	7-Nitroindolinylnyl-
NMDA	N-Methyl-D-aspartat
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
VT	Volumenteil(e)
wt	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

B Das binding gating dilemma

Da Ligandenbindung und Kanalöffnung im Fall ionotroper Rezeptoren miteinander im Gleichgewicht stehen, spiegelt jede makroskopische Größe, die unter stationären Bedingungen bestimmt wird, beide Prozesse wider. Darum ist es grundsätzlich unmöglich, aus solchen Größen quantitative Aussagen über die Teilprozesse zu gewinnen. Der einfachste denkbare Fall eines ligandengesteuerten Ionenkanals soll genügen, um dies verständlich zu machen. Ein hypothetischer Rezeptor soll eine Ligandenbindungsstelle besitzen und die Bindung eines Ligandenmoleküls soll zugleich notwendig und ausreichend für die Kanalöffnung sein, die wiederum in einem kinetischen Schritt erfolgen soll. Der Rezeptorkanal liegt ausschließlich in einem der drei Zustände nicht-ligandiert geschlossen (R), ligandiert geschlossen (RL) und ligandiert offen (RL*) vor, d.h. es existieren beispielsweise keine desensitisierten Zustände. Das (sehr einfache) kinetische Modell für diesen Rezeptor sieht wie folgt aus:



, wobei k_{on} und k_{off} die Ratenkonstanten der Ligandenbindung- bzw. -dissoziation und k_{op} und k_{cl} die der Kanalöffnung und des Kanalverschlusses sind. K_D und E^{-1} sind die Gleichgewichtskonstanten der Teilschritte.

Dieses Modell entspricht dem del Castillo-Katz-Mechanismus, der in der Anfangszeit der Rezeptorforschung zur Beschreibung der Aktivierung von nACh-Rezeptoren der neuromuskulären Endplatte Verwendung fand. Obwohl äußerst einfach, enthielt dieses Modell zur Zeit seiner Veröffentlichung eine ganz wesentliche Neuerung, da erstmals ein zweistufiges Reaktionsschema postuliert wurde, in dem Ligandenbindung und Kanalöffnung als aufeinanderfolgende Teilschritte aufgefaßt werden.

In diesem Sinn bildet der del Castillo-Katz-Mechanismus bis heute die Grundlage aller kinetischen Beschreibungen der Aktivierung ligandengesteuerter Ionenkanäle. Aus dem Modell folgt direkt, daß im Gleichgewicht

$$\begin{array}{lll}
 (1) & RL = R * L / K_D & \text{sowie} \\
 (2) & RL^* = RL * E & \text{und damit} \\
 (3) & RL^* = (R * L * E) / K_D & \text{gilt.}
 \end{array}$$

Der elektrophysiologischen Beobachtung zugänglich ist allein die Population der offenen Rezeptoren, RL^* . Der Anteil der offenen Rezeptoren an der Gesamtpopulation $R_o = RL^* / (RL^* + RL + R)$ ist für den Grenzfall unendlicher Ligandenkonzentration leicht zu errechnen: Bei absoluter Sättigung der Bindungsstelle vereinfacht sich, da keine freien Rezeptoren existieren, der Ausdruck für R_o zu

$$\begin{array}{lll}
 & R_o = RL^* / (RL^* + RL) & \text{woraus sich mit (2)} \\
 & R_o = RL * E / (RL * E + RL) & \text{bzw. nach Kürzen} \\
 (4) & R_o = E / (1 + E) & \text{ergibt.}
 \end{array}$$

Bei einer Ligandenkonzentration entsprechend dem EC_{50} -Wert ist R_o gerade halb so groß, was zum beobachteten halbmaximalen Strom führt. Es gilt also:

$$\begin{aligned}
 RL^* / (RL^* + RL + R) &= \frac{1}{2} * E / (1 + E) \quad \text{bzw. mit (1), (3) und } L = EC_{50} \\
 (R * EC_{50} * E / K_D) / (R * EC_{50} * E / K_D + R * EC_{50} / K_D + R) &= \frac{1}{2} * E / (1 + E) .
 \end{aligned}$$

Nach Kürzen von R , Erweitern mit K_D und Umformen erhält man daraus:

$$(5) \quad EC_{50} = K_D / (1 + E) .$$

EC₅₀-Werte, wie sie beispielsweise aus Dosis-Wirkungskurven bestimmt werden können, sind in diesem einfachen Modell also sowohl von der Affinität für den Liganden als auch von der Effizienz abhängig, mit der der Ligand die Kanalöffnung zu induzieren vermag. Anschaulich ist dies bei der Betrachtung der beiden Extremfälle eines Liganden mit sehr niedriger bzw. sehr hoher Effizienz bezüglich der Kanalöffnung zu verstehen. Für einen Liganden mit sehr geringer Fähigkeit, die Kanalöffnung zu induzieren, werden sich praktisch alle Rezeptoren in den Zuständen R und RL aufhalten. Das Gleichgewicht für die Kanalöffnung wird beinahe ganz auf der geschlossenen Seite liegen und so gut wie keinen Einfluß auf die Gesamtreaktion haben. Der EC₅₀ wird in diesem Fall annähernd mit K_D übereinstimmen. Für einen Liganden mit sehr hoher Effizienz hingegen werden schon bei sehr geringen Ligandenkonzentrationen beinahe alle Rezeptoren im offenen Zustand vorliegen, weil praktisch alle Rezeptoren, die den Liganden binden, auch öffnen und so aus dem Bindungsgleichgewicht entfernt werden. Der EC₅₀-Wert läge daher nahe bei Null.

Begriffsbestimmungen

Aus den hier dargestellten Überlegungen heraus läßt sich feststellen, daß es falsch ist, von EC₅₀-Werten als Affinitäten zu sprechen. Der korrekte Ausdruck wäre in etwa „Konzentration des halbmaximalen beobachtbaren Effekts“. In der Literatur hat sich weitgehend die handlichere, wenn auch leicht mißverständliche Bezeichnung „apparente Affinität“ durchgesetzt, die auch in dieser Arbeit synonym für EC₅₀-Wert gebraucht wird. Die Gleichgewichtskonstante der Ligandenbindung, K_D, wird allgemein und auch hier als „wahre“ oder „mikroskopische“ Affinität bezeichnet. Anstelle von E wird häufig und auch in dieser Arbeit

$$p_o = E / (1 + E)$$

verwendet, was wie in Gleichung (4) gezeigt dem maximalen Anteil offener Rezeptoren an der Gesamtpopulation, also $RL^* / (R + RL + RL^*)$, entspricht, wie er bei

sehr hohen Ligandenkonzentrationen vorliegt, und der hier der Einfachheit halber als „Offenwahrscheinlichkeit“ bezeichnet wird.

C Käfigverbindungen zur Verwendung an NMDA-Rezeptoren

Allgemeines

Eine wesentliche Einschränkung bei der Verwendung von Photolysemethoden stellt die Verfügbarkeit der maskierten Vorstufen der jeweiligen bioaktiven Substanz dar. Die Voraussetzungen, die eine solche Vorstufe erfüllen muß, werden im folgenden kurz beschrieben (s. auch [2] für einen Überblick über die Verwendung von *caged compounds* in biologischen Systemen). Die Effizienz der photolytischen Freisetzung der bioaktiven Substanz ist proportional dem Produkt des Absorptionskoeffizienten der Vorstufe bei der Anregungswellenlänge und der Quantenausbeute der Photolysereaktion. Sie ist von Bedeutung, weil biologische Systeme in der Regel nicht Licht beliebiger Intensität und Wellenlänge ausgesetzt werden können, ohne in ihrer Funktion beeinträchtigt zu werden. Eine hohe Effizienz der Photolysereaktion hilft also, unspezifische Effekte der Belichtung auf das untersuchte System zu vermeiden. Für kinetische Untersuchungen ist neben der Effizienz auch die Geschwindigkeit der Umwandlungsreaktion entscheidend. Sie muß offensichtlich hinreichend schnell sein, um eine Beeinflussung der Kinetik des untersuchten Prozesses auszuschließen. Neben der effizienten und schnellen Freisetzbarkeit der Wirksubstanz im Experiment ist aus praktischen Gründen gleichzeitig eine hohe Stabilität der Verbindung bei der Lagerung wünschenswert. Da die Verbindung für die Verwendung an biologischen Systemen gewöhnlich in wäßrigen Lösungen aufgenommen werden muß, sollte sie also wenigstens kurzzeitig unter diesen Bedingungen stabil sein, d.h. sie sollte nur langsamer spontaner Hydrolyse unterliegen.

Die bisher genannten Anforderungen, wenn auch zum Teil schwierig miteinander vereinbar, betreffen systemunabhängige Eigenschaften der Verbindung, die experimentell gut bestimmbar sind. Zu gängigen *caged compounds* sind die entsprechenden Werte oder wenigstens Schätzungen von ihnen in der Regel in der

Literatur verfügbar. Dagegen sind Wechselwirkungen zwischen *caged compound* oder Nebenprodukten seiner Photolyse und dem biologischen System nicht auf diese Weise generell erfaßbar. Solche Wechselwirkungen können in unzureichender Maskierung, d.h. biologischer Restaktivität der Vorstufe, aber auch in Inhibierung oder Potenzierung der Aktivität der Wirksubstanz bestehen. Da es keine Möglichkeit gibt, derartige Effekte vorherzusagen, sie aber auch eine ansonsten gut geeignete Verbindung für ein bestimmtes System unbrauchbar machen können, muß jede Verbindung vor ihrer erstmaligen Verwendung an diesem System getestet werden.

Maskierte Liganden für Glutamatrezeptoren

Für iGluRs stehen derzeit zwei Substanzklassen zur Verfügung, deren Photolyse ausreichend schnell für kinetische Untersuchungen des Aktivierungsprozesses erfolgt. Es handelt sich hierbei um Derivate der α -Carboxy-2-nitrobenzyl (CNB)- bzw. der 7-Nitroindolin (NI)-Gruppe. CNB-Glutamat wurde bereits 1994 erstmals synthetisiert, ist effizient und schnell, mit einer Halbwertszeit von etwa 21 μ s, photolysierbar und als unter physiologischen Bedingungen relativ stabil gegenüber spontaner Hydrolyse beschrieben [96]. Eine Charakterisierung an glutamatergen Neuronen brachte keine Hinweise auf unerwünschte Wechselwirkungen mit endogen exprimierten Rezeptoren [96]. Während der Durchführung dieser Arbeit wurde CNB-Glutamat erfolgreich für kinetische Analysen an AMPA-Rezeptoren (GluR1 und 2) und einem Kainatrezeptor (GluR6) verwendet, wobei es erneut negativ auf Wechselwirkungen mit diesen Rezeptoren getestet wurde ([57],[59],[58]). Auch eine Reihe anderer NMDA-Rezeptoragonisten stand für diese Arbeit in CNB-maskierter Form zur Verfügung, neben weiteren Liganden der Glutamat-bindungsstelle auch der Koagonist Glyzin. Diese waren zu Beginn der Arbeit jedoch größtenteils nicht am NMDA-Rezeptor oder anderen iGluRs getestet. Eine Ausnahme stellt CNB-NMDA dar, für das ein inhibitorischer Effekt auf NMDA-Rezeptoren hippocampaler Neuronen beschrieben ist [36].

NI-Glutamat und das davon abgeleitete MNI (4-Methoxy-7-nitroindolin)-Glutamat wurden erstmals 1999 bzw. 2000 beschrieben ([74],[73]). Die Photolyseeffizienz für MNI-Glutamat ist der für CNB-Glutamat vergleichbar, die für NI-Glutamat liegt etwa um einen Faktor zwei bis drei niedriger [73], ist aber dennoch ausreichend für Untersuchungen an Glutamatrezeptoren. Die Photolyse beider Verbindungen erfolgt deutlich schneller als die CNB-maskierten Glutamats mit einer Halbwertszeit von etwa 150 ns [67], was allerdings bei den wesentlich langsameren NMDA-Rezeptorkinetiken keine Rolle spielt. Ein Vorteil NI- und MNI-maskierter Verbindungen gegenüber ihren CNB-Gegenstücken ist zudem ihre wesentlich höhere Stabilität. Ihre Hydrolyserate unter physiologischen Bedingungen ist vernachlässigbar niedrig. NI- bzw. MNI-Glutamat wurden ebenfalls bereits früher an glutamatergen Neuronen getestet und zeigten keinerlei Wechselwirkung mit AMPA- und NMDA-Rezeptor-vermittelten Strömen [11]. NI-maskiertes Glyzin ist ebenfalls beschrieben, wurde bisher jedoch nur an Glyzinrezeptoren getestet und zeigt dort einen inhibitorischen Effekt [11]. Für diese Arbeit standen NI- und MNI-Glutamat sowie NI-Glyzin und NI-Aspartat zur Verfügung, wobei die beiden letzteren freundlicherweise von Prof. John E.T. Corrie zur Verfügung gestellt wurden.

D Eine energetische Betrachtung der Bedeutung von Ratenkonstanten

Aus den Ratenkonstanten einer Hin- und Rückreaktion kann die Gleichgewichtskonstante K der Gesamtreaktion berechnet werden und aus dieser über die grundlegende Beziehung

$$\Delta G = -RT \cdot \ln K \quad (1)$$

die Differenz der freien Enthalpien von Produkten und Edukten, wobei R die Gaskonstante und T die absolute Temperatur ist. Im Fall ligandengesteuerter Ionenkanäle sind die wesentlichen Reaktionen die Ligandenbindung, d.h., in der Schreibweise aus Anhang B, $R + L \rightarrow RL$ und die Kanalöffnung, also $RL \rightarrow RL^*$ mit ihren Umkehrreaktionen in Form der Dissoziation und des Schließens des Kanals. Aus den Ratenkonstanten k_{on} , k_{off} , k_{op} und k_{cl} ergeben sich die aus Anhang B bekannten Gleichgewichtskonstanten der Bindung $K_D^{-1} = k_{on}/k_{off}$ und $E = k_{op}/k_{cl}$ und damit die freien Enthalpien der Bindung und der Kanalaktivierung, $\Delta G_{\text{Bindung}} = -RT \cdot \ln (K_D^{-1} \cdot L)$ und $\Delta G_{\text{Kanal}} = -RT \cdot \ln E$. Für den NMDA-Rezeptor mit zwei Bindungsstellen (mit als gleich angenommener Affinität) für Glutamat verdoppelt sich $\Delta G_{\text{Bindung}}$ entsprechend zu $-2 \cdot RT \cdot \ln (K_D^{-1} \cdot L)$.

Ratenkonstanten können darüber hinaus benutzt werden, um Aussagen zum Übergangszustand von Reaktionen zu treffen. Nach der Theorie des Übergangszustandes [32] wird die Geschwindigkeit einer Reaktion durch die freie Aktivierungsenthalpie ΔG^\ddagger bestimmt, die nötig ist, um die energetische Barriere beim Übergang von Edukt zu Produkt zu überwinden. Die Ratenkonstante der Reaktion ergibt sich dabei als

$$k_r = C \cdot e^{-\Delta G^\ddagger/RT} \quad (2),$$

mit $C = \kappa kT/h$, wobei k die Boltzmann-Konstante und h das Plancksche Wirkungsquantum ist. κ wird als Transmissionskoeffizient bezeichnet und kann abhängig von

der Reaktion Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Nur für einfache Reaktionen kann er als 1 angenommen werden, stellt sonst aber prinzipiell eine Unbekannte dar.

Durch entsprechende Umformung von (2) ergibt sich

$$\Delta G^\ddagger = RT \cdot \ln C - RT \cdot \ln k_r \quad (3).$$

Bei Kenntnis des Wertes von C wäre es also möglich, aus der Geschwindigkeitskonstanten einer Reaktion deren freie Aktivierungsenthalpie zu errechnen. Für die meisten Zwecke ergibt sich der eigentliche Nutzen von Gleichung (3) jedoch bei der Betrachtung von Änderungen in Ratenkonstanten. Beträgt die Ratenkonstante einer Reaktion unter bestimmten Bedingungen k_{r1} , unter anderen k_{r2} , dann ergibt sich aus (3) nämlich die Differenz der freien Aktivierungsenthalpien als

$$\Delta \Delta G^\ddagger = \Delta G^\ddagger_2 - \Delta G^\ddagger_1 = RT \cdot \ln (k_{r1} / k_{r2}) \quad (4).$$

Läuft also eine Reaktion bei Raumtemperatur unter Bedingung 2 doppelt so schnell ab wie unter Bedingung 1, bedeutet dies, daß ihre freie Aktivierungsenthalpie unter Bedingung 2 gegenüber 1 um 1,73 kJ/mol verringert ist.

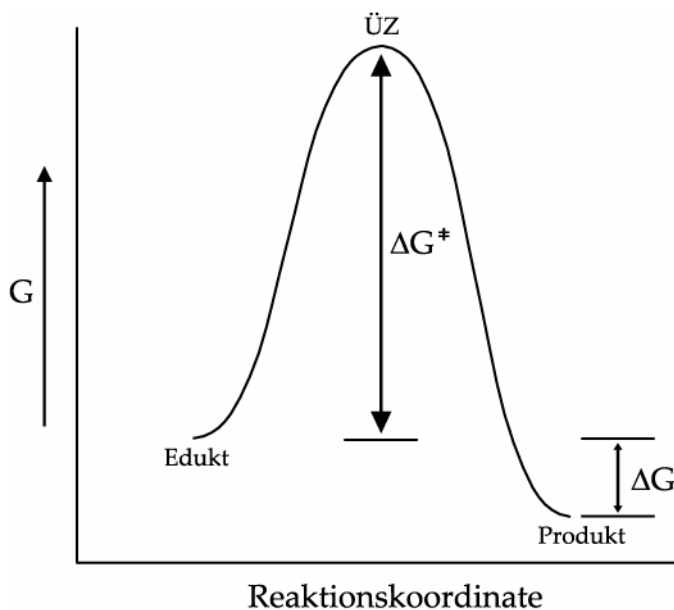


Abb. 38: Der Übergangszustand einer Reaktion im Energiediagramm. Der Übergangszustand stellt das energetische Maximum der Reaktion dar. ΔG^\ddagger ist die freie Aktivierungsenthalpie der Hinreaktion und bestimmt deren Geschwindigkeit. ΔG dagegen ist die Differenz der freien Enthalpien von Produkten und Edukten und bestimmt das thermodynamische Gleichgewicht zwischen diesen.

Für komplexe Reaktionen wie sie bei Konformationsänderungen in Proteinen ablaufen, stellt ein Energiediagramm wie in Abbildung 38 sicherlich eine Vereinfachung der tatsächlichen Verhältnisse dar, da im Reaktionsverlauf zahlreiche lokale Minima und Maxima auftreten werden. Dennoch behalten die hier dargestellten Überlegungen auch dann ihre Gültigkeit und ermöglichen die

Konstruktion von Energiediagrammen der Rezeptoraktivierung ausgehend von den Ratenkonstanten.

Für einen Rezeptor mit zwei Ligandenbindungsstellen und $k_{on} = 10 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{off} = 100 \text{ s}^{-1}$, $k_{op} = 200 \text{ s}^{-1}$, $k_{cl} = 300 \text{ s}^{-1}$ beispielsweise würde sich für eine Aktivierung durch $5 \mu\text{M}$ Ligand folgendes Diagramm ergeben:

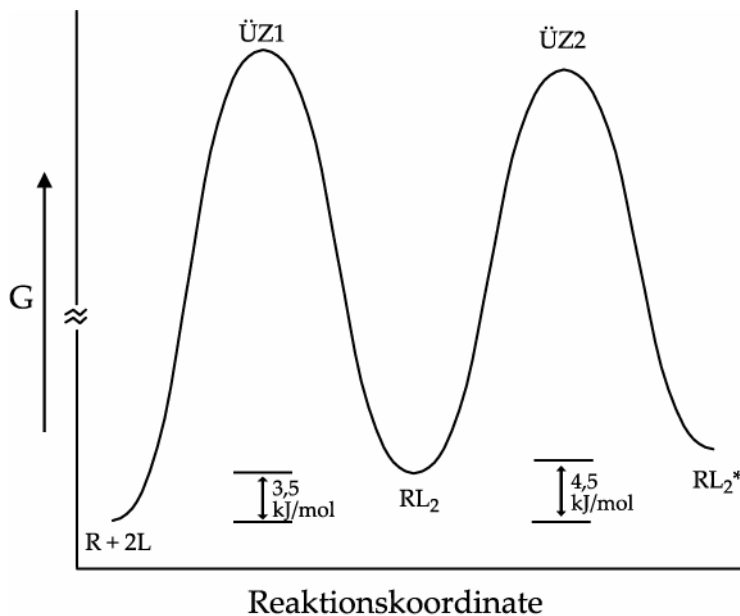


Abb. 39: Energiediagramm der Aktivierung eines hypothetischen ligandengesteuerten Ionenkanals. Das Diagramm ergibt sich aus den im Text angenommenen Ratenkonstanten zusammen mit Gleichung (1). Über die Lage der Übergangszustände kann nichts ausgesagt werden, weil C in Gleichung (2) unbekannt ist. Dies wird durch die Unterbrechung der y-Achse angedeutet.

Solange die Ligandenkonzentration kleiner als K_D ist, ist $\Delta G_{\text{Bindung}} > 0$ und der Zustand $R+L$ damit stabiler als RL . Beide sind thermodynamisch stabiler als RL_2^* , weil ΔG_{Kanal} ebenfalls positiv ist. Unbekannt sind die absoluten freien Enthalpien aller Zustände sowie auch die relative Lage der Übergangszustände, weil für keine der Teilreaktionen ΔG^\ddagger bekannt ist.

Führt man nun aber in den Rezeptor eine Mutation ein, die beispielsweise eine Erhöhung von k_{op} von 200 s^{-1} auf 500 s^{-1} zur Folge hat, während die anderen Parameter unbeeinflusst bleiben, ergibt sich relativ zum wt das Diagramm der Abbildung 40. Die Lage der Zustände $R + 2L$ und RL_2 zueinander hat sich nicht verändert, da K_D gleichgeblieben ist. Auch die Energiebarriere zwischen beiden Zuständen, also die relative Lage von $\ddot{U}Z1$ ist gleichgeblieben, weil sich keine Änderungen in k_{on} und k_{off} ergeben haben. Dagegen ist der offene Zustand RL_2^* jetzt stabiler als RL_2 ($\Delta G_{\text{Kanal}} < 0$, weil $k_{op} > k_{cl}$). Die freie Aktivierungsenthalpie der Kanalöffnungsreaktion $RL_2 \rightarrow RL_2^*$ ist verglichen mit dem wt um $2,29 \text{ kJ/mol}$

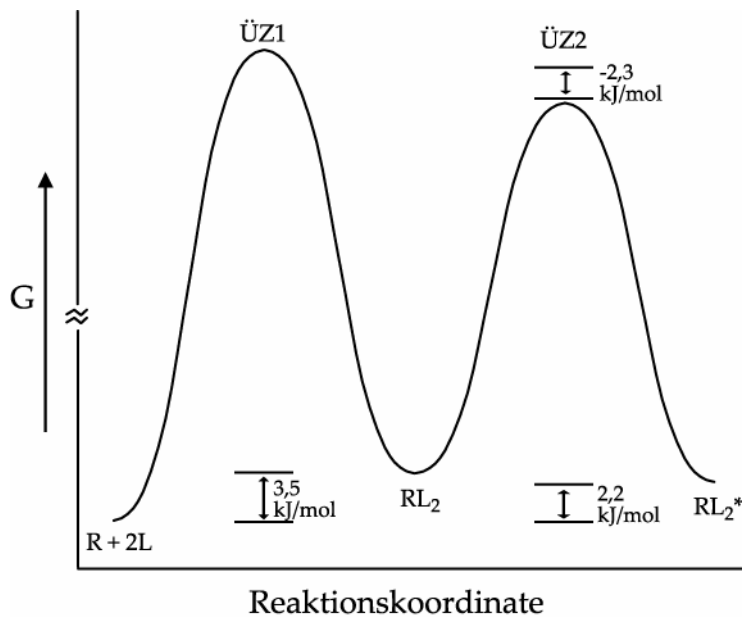


Abb. 40: Energetische Auswirkung einer hypothetischen Mutation des Rezeptors. Wie im Text erläutert ist eine Erhöhung von k_{op} gleichbedeutend mit einer Stabilisierung von $\ddot{U}Z2$ relativ zum geschlossenen Zustand RL_2 . Die Größe des Effekts ergibt sich aus Gleichung (4).

verringert ($RT \cdot \ln(200/500)$), die der Rückreaktion $RL_2^* \rightarrow RL_2$ dagegen unverändert, was bedeutet, daß die Zustände $\ddot{U}Z2$ und RL_2^* durch die Mutation gleichermaßen stabilisiert werden. Dies kann dahingehend interpretiert werden, daß im Übergangszustand der Kanalöffnung die Umgebung des mutierten Restes bereits der des offenen Zustandes RL_2^* gleicht. Eine ausschließliche Beeinflussung von k_{cl} durch eine Mutation würde umgekehrt bedeuten, daß die Umgebung der betreffenden Position im Übergangszustand noch dem geschlossenen Zustand RL_2 entspricht. Der Vergleich von Ratenkonstanten von wt- und mutanten Rezeptoren kann also Aufschluß über die Struktur des Übergangszustands an einer mutierten Stellen des Moleküls geben.

Eine Verfeinerung derartiger Überlegungen stellt die sogenannte ϕ -Wert-Analyse dar [34]. Der ϕ -Wert setzt die durch einen äußeren Einfluß, z.B. eine Mutation, bewirkte Änderung der freien Aktivierungsenthalpie in Relation zur Änderung der freien Enthalpie der Reaktion. Es gilt:

$$\phi = \Delta\Delta G^\ddagger / \Delta\Delta G \quad (5).$$

$\Delta\Delta G^\ddagger$ und $\Delta\Delta G$ können unter Verwendung der Gleichungen (1) und (4) durch die Ratenkonstanten der Reaktion ausgedrückt werden. Wird die ϕ -Wert-Analyse auf die Kanalaktivierung eines Ionenkanals angewandt, sind diese die Öffnungs- und

Schließrate des wt-Kanals $k_{op(wt)}$ und $k_{cl(wt)}$ sowie die entsprechenden Ratenkonstanten des mutanten Kanals $k_{op(mut)}$ und $k_{cl(mut)}$ und es ergibt sich nach Umformungen:

$$\phi = \ln (k_{op(wt)} / k_{op(mut)}) / \ln (E_{(wt)} / E_{(mut)}) \quad (6)$$

mit $E = k_{op} / k_{cl}$ wie zuvor.

Nach Übergang zum dekadischen Logarithmus und einfacher Umformung erhält man daraus:

$$\lg k_{op(wt)} - \lg k_{op(mut)} = \phi * \lg E_{(wt)} - \phi * \lg E_{(mut)},$$

woraus ersichtlich wird, daß der ϕ -Wert dem β -Wert der Brønsted-Gleichung [10]

$$\lg k_2 = \beta * pK_a + A$$

analog ist und seine Definition nach Gleichung (5) nur die Lösung einer analogen Gleichung für zwei Wertepaare darstellt. Die entsprechende Gleichung für den ϕ -Wert lautet:

$$\lg k_{op} = \phi * \lg E + C \quad (7).$$

Werden also beispielsweise mehrere Formen eines Rezeptors erzeugt, in denen der selbe wt-Rest verschieden mutiert wurde, läßt sich gemäß (7) über lineare Regression der ϕ -Wert dieser Position bestimmen, was in der Regel verlässlicher ist als die Bestimmung anhand von nur zwei Wertepaaren [25].

Der interpretierbare Bereich von ϕ -Werten liegt zwischen 0 und 1, wobei ein Wert von 0 entsprechend Gleichung (5) bedeutet, daß eine Mutation E verändert, ohne dabei die freie Aktivierungsenthalpie der Kanalöffnungsreaktion und damit k_{op} zu beeinflussen. Dieser Fall entspricht also Mutationen, die nur k_{cl} betreffen. Umgekehrt tritt der Wert 1 bei Mutationen auf, die nur Auswirkung auf k_{op} haben. Erstere Mutationen wirken sich also auf geschlossenen Zustand und Übergangszustand gleichermaßen aus, letztere auf Übergangszustand und offenen Zustand. Der ϕ -Wert stellt damit eine Quantifizierung der oben dargestellten Überlegungen dar. Intermediäre Werte von ϕ werden dabei in der Regel in dem Sinne interpretiert, daß die Umgebung des betreffenden Restes sowohl dem offenen als auch dem geschlossenen Zustand partiell ähnlich ist.

E Umsetzung des kinetischen Modells in die Skriptsprache der Berkeley Madonna Software

METHOD RK4 ;legt Runge-Kutta 4. Ordnung als Näherungsverfahren fest

STARTTIME = 0 ; Startzeitpunkt der Simulation (0 = Zeitpunkt des Laserblitzes)

STOPTIME=0.04 ; Endzeitpunkt der Simulation (in Sekunden)

DT = 1e-4 ; Zeitintervall des Näherungsverfahrens

; die folgenden Differentialgleichungen stellen das eigentliche kinetische Modell dar

; vgl. II.2.5.3

$d/dt (A[1..n]) = -2 \cdot \text{kon1} \cdot A[i] \cdot L1[i] + \text{koff1} \cdot B[i] - 2 \cdot \text{kon2} \cdot A[i] \cdot L2 + \text{koff2} \cdot D[i]$

$d/dt (B[1..n]) = 2 \cdot \text{kon1} \cdot A[i] \cdot L1[i] - \text{koff1} \cdot B[i] - \text{kon1} \cdot B[i] \cdot L1[i] + 2 \cdot \text{koff1} \cdot C[i] - 2 \cdot \text{kon2} \cdot B[i] \cdot L2 + \text{koff2} \cdot E[i]$

$d/dt (C[1..n]) = \text{kon1} \cdot B[i] \cdot L1[i] - 2 \cdot \text{koff1} \cdot C[i] - 2 \cdot \text{kon2} \cdot C[i] \cdot L2 + \text{koff2} \cdot F[i]$

$d/dt (D[1..n]) = 2 \cdot \text{kon1} \cdot D[i] \cdot L1[i] + \text{koff1} \cdot E[i] - \text{kon2} \cdot D[i] \cdot L2 + 2 \cdot \text{koff2} \cdot G[i] - \text{koff2} \cdot D[i] + 2 \cdot \text{kon2} \cdot A[i] \cdot L2$

$d/dt (E[1..n]) = 2 \cdot \text{kon1} \cdot D[i] \cdot L1[i] - \text{koff1} \cdot E[i] + 2 \cdot \text{koff1} \cdot F[i] - \text{kon1} \cdot E[i] \cdot L1[i] + 2 \cdot \text{kon2} \cdot B[i] \cdot L2 - \text{koff2} \cdot E[i] - \text{kon2} \cdot E[i] \cdot L2 + 2 \cdot \text{koff2} \cdot H[i]$

$d/dt (F[1..n]) = \text{kon1} \cdot E[i] \cdot L1[i] - 2 \cdot \text{koff1} \cdot F[i] + 2 \cdot \text{kon2} \cdot C[i] \cdot L2 - \text{koff2} \cdot F[i] - \text{kon2} \cdot F[i] \cdot L2 + 2 \cdot \text{koff2} \cdot I[i]$

$d/dt (G[1..n]) = 2 \cdot \text{kon1} \cdot G[i] \cdot L1[i] + \text{koff1} \cdot H[i] + \text{kon2} \cdot D[i] \cdot L2 - 2 \cdot \text{koff2} \cdot G[i]$

$d/dt (H[1..n]) = 2 \cdot \text{kon1} \cdot G[i] \cdot L1[i] - \text{koff1} \cdot H[i] - \text{kon1} \cdot H[i] \cdot L1[i] + 2 \cdot \text{koff1} \cdot I[i] + \text{kon2} \cdot E[i] \cdot L2 - 2 \cdot \text{koff2} \cdot H[i]$

$d/dt (I[1..n]) = \text{kon1} \cdot H[i] \cdot L1[i] - 2 \cdot \text{koff1} \cdot I[i] + \text{kon2} \cdot F[i] \cdot L2 - 2 \cdot \text{koff2} \cdot I[i] - \text{kop} \cdot I[i] + \text{kcl} \cdot J[i]$

$d/dt (J[1..n]) = \text{kop} \cdot I[i] - \text{kcl} \cdot J[i]$

; Skalierung des Stroms proportional zum Anteil offener Rezeptoren

; durch Berücksichtigung von $(1 + \text{kcl}/\text{kop})$ wird die Zuweisung sinnvoller Startwerte an SIZE vereinfacht

$\text{Iobs}[1..n] = \text{SIZE} \cdot (1 + \text{kcl}/\text{kop}) \cdot J[i]$

$\text{St1} = \text{Iobs}[1]$; macht Einzelstrom für Darstellung zugänglich, n Zuweisungen dieser Art erforderlich

$\text{St2} = \text{Iobs}[2]$

$\text{St3} = \text{Iobs}[3]$

; ...

$\text{Stn} = \text{Iobs}[n]$

; Startwerte der Parameter, werden besser im Programm gewählt

$\text{K1} = 9.5\text{e6}$

$\text{K2} = 50$

$\text{K3} = 10\text{e6}$

$\text{K4} = 15$

$\text{K5} = 89$

$\text{K6} = 135$

$\text{SIZE} = 0.5$

; Zahl der anzupassenden Ströme

$n = 6$

; Angabe der in den einzelnen Messungen freigesetzten Ligandenkonzentrationen (in M)

$\text{L1}[1] = 1\text{e-6}$

$\text{L1}[2] = 3\text{e-6}$

$L1[3]=10e-6$

; ...

; $L1[n]=x$

$L2=50e-6$; Konzentration des Koagonisten

; Errechnung der Besetzung der einzelnen Rezeptorpopulationen zu Beginn der Messung

; d.h. nach Äquilibration mit dem Koagonisten

; Zustände A, D, G sind bereits vor Ligandenfreisetzung besetzt

$L1H=0$

$L2H=50e-6$

$AH=1$

$BH=2*AH*K1*L1H/K2$

$CH=AH*K1^2*L1H^2/K2^2$

$DH=2*AH*K3*L2H/K4$

$GH=AH*K3^2*L2H^2/K4^2$

INIT $A[1..n]=AH/(AH+BH+CH+DH+GH)$

INIT $B[1..n]=BH/(AH+BH+CH+DH+GH)$

INIT $C[1..n]=CH/(AH+BH+CH+DH+GH)$

INIT $D[1..n]=DH/(AH+BH+CH+DH+GH)$

INIT $G[1..n]=GH/(AH+BH+CH+DH+GH)$

INIT $E[1..n]=0$

INIT $F[1..n]=0$

INIT $H[1..n]=0$

INIT $I[1..n]=0$

INIT $J[1..n]=0$

Ich danke ...

Herrn Prof. Dr. Ernst Bamberg für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am MPI für Biophysik sowie sein großzügiges Entgegenkommen in vielerlei Hinsicht, besonders aber bei der Finanzierung meiner Arbeit,

Herrn Prof. Dr. Heinrich Betz für den Arbeitsplatz am MPI für Hirnforschung, seine auch auf andere übergreifende Begeisterung für Wissenschaft und seine Bereitwilligkeit seine Erfahrung in vielen Bereichen zu teilen,

Herrn Prof. Dr. Christof Grewer für die hervorragende Betreuung und seine stete Diskussionsbereitschaft auch und besonders seit seiner Zeit in den USA. Danke auch für die Einladung nach Miami,

Herrn Dr. Bodo Laube für die Betreuung der Arbeit und seine Begeisterungsfähigkeit auch für teils weit hergeholte (und oft falsche) Hypothesen. Vor allem aber für das sehr gute Arbeitsklima in seiner Gruppe, zu dem er mit seiner offenen und entspannten Art ganz entscheidend beiträgt,

Herrn Dr. Rudolf Schemm für das *Molecular Modelling* und für sein Den-harten-Kern-der-Mensafraktion-Bilden,

Joanna Grudzinska, Thomas Schüler und Dr. Dirk Zimmermann, die die Laborarbeit sehr oft sehr viel angenehmer bzw. im Fall von Dirk die Abende sehr diskussionsfreudig (und die folgenden Labortage dafür oft um so anstrengender) gestaltet haben. Joanna außerdem besonders für ihre Hilfsbereitschaft und das „Teilen“ verschiedenster Lösungen, Geräte, usw., wovon ich zweifellos deutlich mehr als sie profitiert habe; zudem für das Überlassen in aller Regel erstklassiger Zellen für die Elektrophysiologie, womit sie nicht unwesentlichen Anteil am Zustandekommen dieser Arbeit hat,

sowie allen anderen, die zum Gelingen der Arbeit und zur sehr angenehmen Atmosphäre an beiden Instituten beigetragen haben.

Dankbar bin ich zudem für die Zusammenarbeit mit

Prof. Dr. John E. Corrie am NIMR in London, ohne dessen teils eigens synthetisierte NI-/MNI-Verbindungen diese Arbeit praktisch nicht durchführbar gewesen wäre und

Prof. Dr. Anne Stephenson an der School of Pharmacy der Universität London, ohne deren Anregung und Überlassung mehrerer cDNAs die Abschnitte zu PSD95 in dieser Arbeit fehlen würden.

Publikationen im Zusammenhang mit der Doktorarbeit

Maier W., Corrie J.E., Papageorgiou G., Laube B., Grewer C.: Comparative Analysis of Inhibitory Effects of Caged Ligands for the NMDA Receptor. J. Neurosci. Methods, 2005, 142: 1-9

Posterbeiträge zu Konferenzen:

Maier W., Laube B., Grewer C.: Photolysis of Caged Ligand Precursors as a Tool to Study Channel-Opening Kinetics of the NMDA Receptor. Conférence Jacques Monod 2002, Anglet, Frankreich

Maier W., Grewer C., Laube B., Betz H.: Kinetic Effects of Mutations in the NMDA Receptor Glutamate Binding Domain. Society for Neuroscience, 33rd Annual Meeting 2003, New Orleans, USA

Lebenslauf

Name: Wolfgang Maier

geboren am: 17.2.1975

Geburtsort: Straubing

1981-1985 Grundschule St. Peter in Straubing

1985-1994 Johannes-Turmair-Gymnasium in Straubing

Okt. 1994-Sep. 1995 Grundwehrdienst in Traunstein

Nov. 1995-Aug. 2000 Biochemiestudium an der Universität Regensburg

davon Nov. 1999-Aug. 2000 Diplomarbeit am Lehrstuhl Biochemie III der
Universität Regensburg bei Prof. Dr. Georg Löffler

Abschluß: Diplom

seit Jan. 2001 Promotionsarbeit in Frankfurt am Main am Max-Planck-
Institut für Biophysik, Abteilung Biophysikalische
Chemie bei Prof. Dr. Ernst Bamberg und am Max-
Planck-Institut für Hirnforschung, Abteilung
Neurochemie bei Prof. Dr. Heinrich Betz